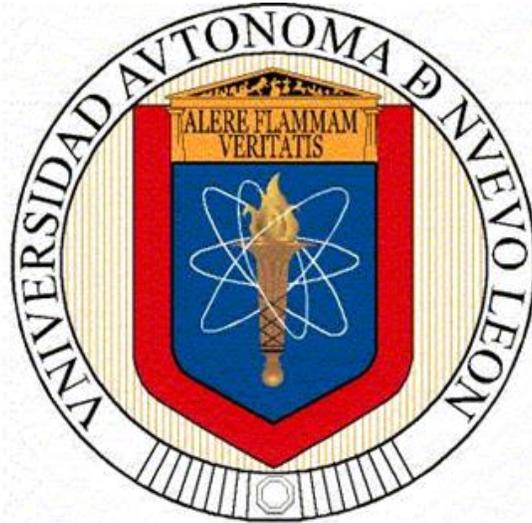


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“DESARROLLO DE UNA VACUNA DE LISADO TUMORAL PARA LA
PREVENCIÓN DEL TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO”**

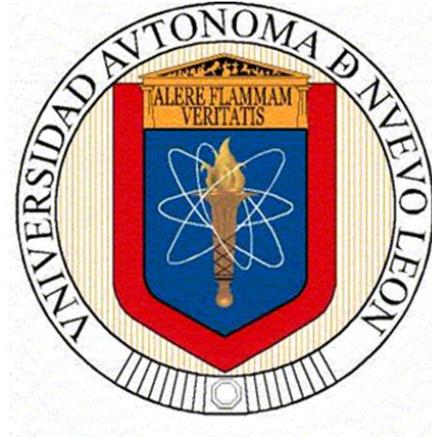
POR

M.C. ALEX JESÚS HERNÁNDEZ GRANADOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**“DESARROLLO DE UNA VACUNA DE LISADO TUMORAL PARA LA
PREVENCIÓN DEL TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO”**

POR

M.C. ALEX JESÚS HERNÁNDEZ GRANADOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2018

“Desarrollo de una vacuna de Lisado tumoral para la prevención del Tumor venéreo transmisible canino”

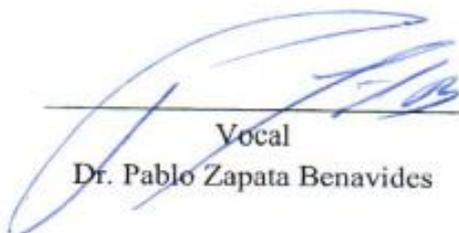
COMITÉ DE TESIS



Director de tesis
Dr. Moisés A. Franco Molina



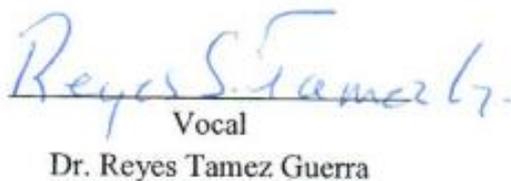
Secretario
Dra. Cristina Rodríguez Padilla



Vocal
Dr. Pablo Zapata Benavides



Vocal
Dr. Edgar Mendoza Gamboa



Vocal
Dr. Reyes Tamez Guerra



El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
NOMENCLATURA	VII
RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Inmunología del cáncer.....	5
2.2 Antígenos tumorales.....	6
2.3 Muerte inmunogénica.....	8
2.4 Células inmunes en cáncer.....	10
2.5 Vacunas contra el cancer.....	11
2.6 Lisado tumoral completo.....	13
2.6.1 Acido hipocloroso.....	14
2.6.2 Maduración de las Células Dendríticas.....	15
2.7 Microambiente inmunosupresor.....	16
2.8 Cáncer transmisible.....	18

2.8.1 Tumor Venéreo Transmisible Canino.....	18
2.8.2 Histología del TVT.....	20
2.8.3 Genética del TVT.....	21
3 HIPÓTESIS.....	27
4 OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo General.....	27
4.2 Objetivos Particulares.....	27
5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
5.1 Diseño experimental.....	28
5.2 Animales.....	29
5.3 Tumor Venéreo Transmisible.....	29
5.4 Preparación del lisado tumoral	30
5.4.1 Acido hipocloroso.....	31
5.5 Inmunización con el LTVT.....	31
5.6 Evaluación de la seguridad e inocuidad del lisado tumoral.....	32
5.6.1 Respuesta inmune celular frente al lisado tumoral.....	33
5.6.2 Evaluación de citocinas en caninos inmunizados.....	34
5.6.3 Volumen tumoral.....	34

5.7	Análisis estadístico.....	34
6	RESULTADOS.....	35
6.1	Cultivo primario del TVT.....	35
6.2	Evaluación de la fagocitosis de las células de TVT.....	35
6.2.1	Evaluación de la maduración de CD8 y producción de citocinas.....	36
6.3	Las CD8 caninas cargadas con HOCl-L promueven la activación de células CD8 ⁺ secretoras de IFN γ	39
6.3.1	CTLs generados por DCs cargados HOCl-L son capaces de matar a las células TVT.....	40
6.4	Inhibición del crecimiento tumoral en caninos inmunizados con lisado del TVT..	41
6.5	Incremento de los linfocitos T citotóxicos CD8 ⁺ en sangre periférica de caninos inmunizados con el lisado de TVT.....	43
6.6	Evaluación del perfil de citocinas en el suero de caninos inmunizados con el lisado del TVT.....	44
7	DISCUSIÓN.....	45
8	CONCLUSIONES.....	49
9	LITERATURA CITADA.....	50
10	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	57

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a todas las personas que me hicieron sentir como en casa todo este tiempo, a mis compañeros y amigos.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Gracias a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

CONACYT. Gracias por el apoyo económico y de infraestructura.
También agradecer al Dr. Moisés Franco Molina.

Gracias...

DEDICATORIA

A mi familia y a todos los que me han apoyado durante tantos años, es para ustedes...

LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Grupos experimentales.....	29

LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Metodologías para la obtención de antígenos asociados a tumor.....	7
Figura 2. Antígenos específicos de tumor (Neo- antígenos).....	8
Figura 3. Patrones moleculares asociados a daño celular y la interacción con el sistema inmunológico.....	9
Figura 4. Vacunas contra el cáncer específicas de tumor.....	13
Figura 5. Tumor Venéreo Transmisibile canino en el órgano genital de un macho.....	19
Figura 6. Estrategia experimental en la prevención del TVT.....	32
Figura 7. Evaluación de la fagocitosis de las células de TVT.....	36
Figura 8. Maduración de células dendríticas con diferentes lisados del TVT.....	37
Figura 9. Fenotipificación de células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica.....	38
Figura 10. Evaluación del perfil de citocinas de células dendríticas caninas pulsadas con diferentes preparaciones del lisado tumoral de TVT.....	39
Figura 11. Las DCs caninos cargados con HOCl-L promueven la activación de las células T CD8 ⁺ secretoras de IFN γ	40
Figura 12. Los CTL generados por los DC cargadas con HOCl-L son capaces de eliminar las células TVT.....	41
Figura 13. Inhibición del crecimiento tumoral en caninos inmunizados con lisado del TVT.....	42
Figura 14. Incremento de los linfocitos T CD8 ⁺ en sangre periférica de caninos inmunizados con HOCl-L.....	43
Figura 15. Evaluación del perfil de citocinas en el suero de caninos inmunizados con el lisado del TVT.....	44

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
CRT	Calreticulina
DLA	Dog Leukocyte antigen
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
HLA	Antígeno leucocitario humano
HOCl	Acido hipocloroso
IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
LTVT	Lisado del Tumor Venéreo Transmisible
LTC	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocitos T cooperadores
MCI	Muerte celular inmunogénica
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer
nTregs	T reguladoras naturales
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
Pg	Picogramos
PGE	Prostaglandina
rmp	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico

RNAi	RNA de interferencia
SFB	Suero Fetal Bovino
STAT	Transmisoras de señal y activadoras de la transcripción
TAM	Macrófagos asociados a tumor
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TIL	Linfocito Infiltrante de tumor
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TAA	Antígenos asociados a tumor
TVT	Tumor Venéreo Transmisible

RESUMEN

Existe evidencia experimental que demuestra la participación activa del sistema inmune en el control y la eliminación del cáncer. La inmunoterapia del cáncer está conformada por una serie de técnicas como el uso de anticuerpos monoclonales, terapia con células, citosinas, etc. Sin embargo, en el pasado las terapias contra el cáncer fueron dirigidas contra un solo blanco antigénico o péptido único (HER2, Neu, Wt1, gp100) con resultados poco favorables debido a la gran complejidad del microambiente tumoral y mecanismos de evasión al sistema inmunológico como pérdida de los antígenos tumorales. En la actualidad se presentan alternativas como el lisado tumoral completo como fuente múltiple de antígenos tumorales resultando en una amplia respuesta específica de tumor de tipo T policlonal, dirigida contra múltiples epitopos tumorales, logrando evitar la evasión tumoral. Hoy en día la investigación sobre el cáncer en modelos animales tiene como objetivo generar información que pueda ser trasladada a la clínica con pacientes humanos, debatiendo en congresos de oncología comparativa la pobre representación del cáncer humano en modelos murinos, surgiendo alternativas como el modelo canino en el cual se puede representar de mejor manera el cáncer humano, debido a similitudes genéticas, antigénicas e histológicas entre ambos cánceres. Desde sus inicios, en el campo de la inmunoterapia se han realizado numerosos ensayos clínicos en pacientes con cáncer, obteniendo casos de regresión tumoral completa con recuperación clínica de la enfermedad y en modelos animales alargando la vida de los mismos. En el presente trabajo se evaluó la actividad protectora antitumoral de tres diferentes lisados tumorales en la prevención del Tumor venéreo transmisible canino (TVT), utilizando tres diferentes estrategias para la preparación de cada lisado tumoral; modificación oxidativa con ácido hipocloroso (HOCl-L), stress con choque de calor (HS-L) o ciclos de congelación-descongelación (FT-L). Se inmunizaron 3 grupos de caninos, cada grupo con un lisado diferente (3 dosis, semanal, 1 mg de lisado, eq. 1×10^7 cel. TVT), 15 días después de la última inmunización se llevó a cabo el desafío con el tumor y se evaluó la respuesta inmunitaria de la vacuna: efectos secundarios, la respuesta celular ($CD3^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$), citocinas IL-2, IL-12, $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ en el suero para finalmente determinar la presencia y volumen tumoral en los diferentes grupos experimentales de caninos, se utilizó Anova de una vía, Prueba de Tukey y fue considerado como estadísticamente diferente cuando $p < 0.05$.

ABSTRACT

There is experimental evidence that demonstrates the active participation of the immune system in the control and elimination of cancer. Cancer immunotherapy is made up of a series of techniques such as the use of monoclonal antibodies, cell therapy, cytosines, etc. However, in the past, anti-cancer therapies were directed against a single antigenic target or single peptide (HER2, Neu, Wt1, gp100) with unfavorable results due to the great complexity of the tumor microenvironment and evasion mechanisms to the immune system. loss of tumor antigens. At present, there are alternatives such as the complete tumor lysate as a multiple source of tumor antigens, resulting in a broad specific response of a polyclonal T-type tumor, directed against multiple tumor epitopes, thus avoiding tumor evasion. Nowadays the research on cancer in animal models aims to generate information that can be transferred to the clinic with human patients, debating in comparative oncology congresses the poor representation of human cancer in murine models, emerging alternatives such as the canine model in which can best represent human cancer, due to genetic, antigenic and histological similarities between both cancers. Since its inception, in the field of immunotherapy there have been numerous clinical trials in cancer patients, obtaining cases of complete tumor regression with clinical recovery of the disease and in animal models extending the life of them. In the present work we evaluated the antitumor protective activity of three different tumor lysates in the prevention of canine transmissible canine tumor (TVT), using three different strategies for the preparation of each tumor lysate; oxidative modification with hypochlorous acid (HOCl-L), stress with heat shock (HS-L) or freeze-thaw cycles (FT-L). Three groups of canines were immunized, each group with a different lysate (3 doses, weekly, 1 mg of lysate, eq 1×10^7 cel.TVT), 15 days after the last immunization the challenge with the tumor was carried out and evaluated the immune response of the vaccine: side effects, the cellular response (CD3 +, CD4 + and CD8 +), cytokines IL-2, IL-12, TNF α and IFN γ in the serum to finally determine the presence and tumor volume in the different experimental groups of canines, One-way Anova was used, Tukey test and was considered as statistically different when $p < 0.05$.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que comienzan a multiplicarse sin control de manera autónoma, lo que se denomina tumor o neoplasia. De manera sucesiva estas células pueden adquirir capacidad invasiva que les permite colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis (Engels *et al.*, 2007). Se conocen más de 200 tipos de cáncer según el tejido en el que se originan. Sin embargo, el cáncer no es una enfermedad única, es una colección de enfermedades que tienen distintas manifestaciones histopatológicas, con variaciones genéticas y distintos comportamientos clínicos. Uno de los mayores retos para avanzar en el conocimiento de la biología del cáncer es el acceso a un modelo experimental que recapitule las distintas formas de la enfermedad. Sin embargo, debido a su complejidad y heterogeneidad, no hay un modelo único que pueda mimetizar todos los aspectos de la enfermedad. La importancia de esta enfermedad sugiere la generación de nuevas terapias contra el cáncer, es cada vez mayor la evidencia experimental y clínica de que el sistema inmunitario interviene activamente en la patogénesis y el control de la progresión tumoral. Una respuesta antitumoral efectiva depende de la correcta interacción de varios componentes del sistema inmunitario, como las células presentadoras de antígeno y diferentes sub-poblaciones de linfocitos T (Harimoto *et al.*, 2013). La inmunoterapia del cáncer tiene por objeto la utilización del sistema inmune para rechazar tumores o para evitar que se repitan. La inmunoterapia del cáncer comprende métodos pasivos o activos, la inmunoterapia pasiva consiste en la administración de forma exógena de anticuerpos o células inmunes transferidos adoptivamente (típicamente células T) para mediar una respuesta inmune anti-cáncer. En cuanto a la inmunoterapia activa (vacunación), su principal objetivo es activar las células inmunes endógenas para reconocer antígenos asociados a tumor (TAA) y eliminar las células cancerosas, con un mínimo daño de las células sanas. Los tumores malignos desarrollan numerosos mecanismos para evadir el reconocimiento y su eliminación por parte del sistema inmunitario por lo cual la inmunoterapia ideal contra el cáncer es inducir una respuesta inmune altamente específica y duradera (Ingram *et al.*, 2000). Las CD llevan a cabo el procesamiento y presentación de antígeno a los linfocitos T, a través de la vía del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II que activa a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ los cuales presentan una especificidad de antígeno y gran capacidad para destruir células tumorales y células madre del cáncer. Por otra parte las células tumorales con frecuencia experimentan elevadas tasas

de mutación que podría resultar en la pérdida de un único o múltiples antígenos, sin embargo a pesar de esto, la mayoría de las vacunas con células dendríticas están dirigidas contra un solo blanco antigénico debido a que son pulsadas con péptido único (HER2, Neu, Wt1, gp100) con respuestas clínicas poco favorables debido a numerosos mecanismos de evasión tumoral y mutaciones con edición antigénica. Por lo cual la respuesta inmune en pacientes con cáncer limitada a un solo péptido para la inmunización podría ser insuficiente para controlar el crecimiento del tumor, continuando con el proceso de metástasis y formación de focos tumorales en lugares distantes, obteniendo terapias poco exitosas (Chen *et al.*, 2013). En la actualidad se evalúan estrategias como el lisado tumoral para pulsar a las células dendríticas, el cual está conformado con señales de daño asociadas a tumor los cuales ayudan en la activación, maduración e incremento de la fagocitosis en las CD y además actúa como una fuente múltiple de antígenos tumorales, es decir, todos los antígenos del tumor disponibles para la activación de una amplia respuesta específica de tumor de tipo T policlonal, dirigida contra múltiples epitopos tumorales, logrando evitar la evasión tumoral y con mayores posibilidades de eliminar al tumor. Sin embargo en algunos ensayos clínicos con vacunación con células dendríticas pulsadas con lisado tumoral alogénico algunos pacientes no respondieron al tratamiento, esto puede ser explicado por la ausencia de suficientes señales inmunogénicas de daño asociadas con Ags, y como consecuencia un deficiente procesamiento y presentación del antígeno por las CD. La tumorigénesis incluye las fases de crecimiento *in situ*, invasión, extravasación y metástasis. Durante estas fases, las células tumorales interactúan con su microambiente tolerogénico y son influenciadas por señales que provienen del estroma, del endotelio vascular y del sistema inmunitario (Akira *et al.*, 2001). En este contexto, los tumores sólidos están infiltrados por diferentes tipos celulares, como linfocitos, macrófagos y mastocitos. Generalmente se ha asociado a estos últimos con la producción de factores relacionados con la inflamación crónica y la progresión tumoral, mientras que el infiltrado de sub-poblaciones de linfocitos B y T, células NK y células dendríticas se ha relacionado con el control de la enfermedad y mejor pronóstico en muchos tipos de cáncer como melanoma, ovario, linfoma no Hodgkin, cáncer de cérvix, etc. Actualmente se han realizado más de un centenar de ensayos clínicos valorando la efectividad de los diferentes tipos de vacunas para el tratamiento del cáncer. Estos estudios muestran ocasionalmente regresiones objetivas de la masa tumoral en pacientes con enfermedad avanzada o estabilizada durante períodos prolongados de tiempo. Sin embargo, muy pocos estudios consiguen incrementos significativos en la supervivencia alcanzada (Yang *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES

El cáncer es agresivo, pero el sistema inmune lo es más, lo comentaron en el XI Simposium internacional sobre alergias y autoinmunidad en la cual explicaron como el sistema inmune puede matar a un sujeto en cuestión de segundos. Alguna vez en la vida nuestras células han experimentado mutaciones que pueden desencadenar el inicio de un proceso canceroso, pero gracias a la vigilancia de nuestro sistema inmune en la mayoría de los casos las células mutadas son eliminadas, argumentando que el cáncer aparece cuando las células alteradas evaden al sistema inmune a través de múltiples mecanismos dando lugar a la tumorigénesis. Hoy en día existe evidencia experimental y clínica en la cual se demuestra como el sistema inmune interviene activamente en el control y eliminación del tumor. Por lo tanto si la evolución ha creado en los seres humanos un sistema tan eficaz como el inmunológico para prevenir y eliminar la aparición del cáncer, está claro que las principales terapias deben estar enfocadas en la estimulación del sistema inmune (Colvin *et al.*, 2009). Hace más de un siglo se observó que pacientes con cáncer que contraían infecciones bacterianas sobrevivían más tiempo que aquellos que no, relacionando a la infección bacteriana como estimulación del sistema inmune y desencadenando un efecto antitumoral, surgiendo lo que hoy se conoce como inmunoterapia del cáncer. Actualmente se han incrementado los esfuerzos por encontrar una terapia efectiva contra el cáncer con la cual se pueda alargar el tiempo y calidad de vida de los pacientes, sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos y modelos animales demuestran resultados poco favorables, solo con algunos casos aislados de regresión tumoral completa, por lo cual el futuro prometedor de la inmunoterapia del cáncer debe estar acompañado de los errores cometidos en el pasado, porque aceptando y modificando los resultados negativos podremos encaminarnos hacia una terapia eficaz con la cual podremos tener mayores posibilidades de eliminar el tumor y evitar su recurrencia (Gao *et al.*, 2013). El éxito de cualquier terapia contra el cáncer radica en superar el ambiente inmunosupresor en el cual se encuentra inmerso la mayor parte de los tejidos del sujeto, convergiendo con los principales obstáculos a vencer impuestos por el tumor; la inactivación, anergia y cambio a fenotipo regulador de las células efectoras antitumorales y el reconocimiento de neo-antígenos por las células presentadoras de antígeno funcionales con capacidad de activación de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Se le denomina cáncer a un grupo de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento celular autónomo de manera descontrolada a nivel local y que puede ir acompañado

de invasión a tejidos circundantes y dispersión de células a sitios distantes, denominándose metástasis (Havranek *et al.*, 2002). La célula cancerosa pierde el control de su propio desarrollo, de modo que se divide en gran cantidad de células a mayor velocidad que el resto del tejido normal al que pertenece sin cumplir con las funciones para la que fue creada (Lu and Han, 2003), el crecimiento anormal de células puede llegar a formar masas de tejidos llamados tumores, una característica del cáncer es la alteración de los mecanismos reguladores del crecimiento, proliferación y muerte celular programada, entre ellos destacan; la evasión de la apoptosis por alteración o mutación de los genes pro-apoptóticos (también llamados genes supresores de tumor) como p53 o en algunos casos la sobreexpresión de genes que inducen proliferación celular como myc, otro gen también relacionado con el cáncer es bcl-2 que en estado de hiperactividad participa en el desarrollo de una gran cantidad de patologías neoplásicas por supresión de la apoptosis (Erolesa *et al.*, 2012). El proceso por el cual se origina el cáncer (carcinogénesis) es causado por anomalías en el material genético de las células, el ADN, estas alteraciones pueden ser provocadas por distintos agentes carcinógenos, como la radiación ionizante, radiación ultravioleta, productos químicos procedentes de la industria, humo del tabaco o por errores naturales que se producen durante el proceso de replicación del ADN y que no son reparados, o bien son heredadas y por consiguiente se presentan en todas las células desde el nacimiento y originan mayor probabilidad de que se presente la enfermedad (Harrington *et al.*, 2007). La dieta también se ha mencionado como un factor clave que puede predisponer al desarrollo de cáncer, las vitaminas pueden actuar como antioxidantes previniendo la aparición del cáncer, en cambio una dieta rica en carbohidratos puede predisponer a cáncer de colon y rectal, la inflamación crónica puede conducir a un estado de transformación maligna por aquellos metabolitos tóxicos o especies reactivas de oxígeno que se producen durante el proceso de inflamación en el combate de las células del sistema inmune contra patógenos de difícil erradicación y que pueden lesionar al ADN de células normales circundantes (Jones and Cross, 2004). A nivel molecular el cáncer se desarrolla a partir de la acumulación de mutaciones genéticas en el ADN (deleciones, inserciones, sustituciones) de secuencias que codifican proteínas críticas para el control del crecimiento, proliferación y muerte celular, también se ha evidenciado que existen protooncogenes celulares que pueden ser activados por mutación y la expresión anormal de estos conduce a la transformación en una célula cancerosa, también algunos mecanismos celulares de reparación del ADN pueden verse afectados durante el proceso de replicación del ADN (falla en el rompimiento de doble cadena e inicio de reparación

por recombinación, falta de eliminación de dímeros de timina generados por luz ultravioleta, etc.), por lo que hay mayor probabilidad del desarrollo tumoral (Kakimi *et al.*, 2009). También se han descrito otras causas de cáncer en donde figuran los agentes infecciosos, como el virus del papiloma humano o el virus de la hepatitis B, en el siglo pasado se descubrió que estos virus ADN o ARN son capaces de introducir oncogenes virales en el material genético de la célula, resultando en la transformación maligna de la célula y desarrollo de cáncer, por lo tanto el cáncer es una enfermedad multifactorial con características específicas que dependen de cada tipo de tumor y que de no atenderse a tiempo pueden terminar con la vida del individuo por falla del funcionamiento normal del tejido u órgano afectado, aunado a la compresión que pueden ejercer ciertos tumores sólidos sobre tejidos circundantes (sistema nervioso central y periférico) y a la complicación con infecciones secundarias oportunistas por los estados de inmunosupresión en los individuos con cáncer (Gillison, 2004). En la actualidad se conocen más de 200 tipos de cáncer. El 70% de todas las muertes por cáncer registradas en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas. Los cánceres que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios (índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol), por lo tanto, pueden prevenirse (Jones and Cross, 2004).

2.1 Inmunología del cáncer

Observaciones experimentales han demostrado que a pesar de que las células tumorales derivan de células propias del hospedador, los tumores desencadenan respuestas inmunitarias que pueden conducir al rechazo o progresión del tumor, ya que en estudios histopatológicos se ha detectado la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), que en algunos casos puede ser de buen pronóstico pero en algunas ocasiones están implicados en el favorecimiento del crecimiento tumoral, quedando a debate el significado de los TIL en el microambiente tumoral (Yu and Hyun, 2013). Es bien conocido el papel del sistema inmunológico en el reconocimiento de moléculas extrañas, incluidas las proteínas propias alteradas producidas durante el crecimiento tumoral que se expresan de manera aberrante o excesiva en las células transformadas, las cuales son conocidas como antígenos

asociados a tumor, por ejemplo; tirosinasa, gp100, HSP70, MAGE, BAGE, CEA y AFP. También existen antígenos que son exclusivos de la célula tumoral y que no se expresan en una célula normal, llamados antígenos específicos de tumor, como ejemplo la fosfatasa ácida prostática, en cáncer de próstata, cuyo antígeno es utilizado en la producción de la primera vacuna terapéutica a base de células dendríticas aprobada por la FDA, Sipuleucel (Rescigno *et al.*, 2007). En condiciones normales se plantea como hipótesis que el sistema inmune puede desarrollar una eficaz respuesta antitumoral, es decir, el sistema inmune puede controlar y destruir a las células cancerígenas que se producen en un individuo, sin embargo la gran cantidad de muertes por cáncer hace pensar que esto no siempre ocurre así, por lo que deben existir mecanismos para evasión del sistema inmune. En primer lugar las células tumorales que se producen de manera natural al derivar de células normales tienden a ser poco inmunogénicas o casi indetectables para el sistema inmune, a menos que sean causadas por agentes virales, causando tolerancia inmunológica hacia el tumor y favoreciendo la progresión tumoral (Atsutaka *et al.*, 2014). Segundo, al ser genéticamente inestables las células tumorales tienden a cambiar la expresión de los antígenos tumorales para los que se ha desencadenado una respuesta inmune. Tercero, las células tumorales expresan bajas cantidades de co-estimuladores y moléculas del MHC clase I, por lo que no pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Por último los productos del tumor como citocinas supresoras (IL-10 y TGF- β) tienden a producir una alteración e inactivación de las células del sistema inmune innato como células dendríticas, macrófagos, NK, TNK, que conduce a una falta de activación de células efectoras del sistema inmune adaptativo (Linfocitos T cooperadores y citotóxicos), favoreciendo la diferenciación de T reguladores y conllevando al crecimiento del tumor. Por el contrario también ha sido reportada la regresión espontánea de algunos tumores en individuos sin ninguna intervención terapéutica, atribuible a la respuesta inmune, sugiriendo que las células T han reconocido a las células tumorales como extrañas (Kaminski *et al.*, 2003).

2.2. Antígenos tumorales

Los pobres resultados obtenidos hasta ahora vienen determinados, fundamentalmente, por la dificultad en aislar antígenos tumorales específicos que puedan ser reconocidos como extraños y con la suficiente capacidad para estimular el sistema inmunitario. La mayoría de estos antígenos han sido definidos en modelos murinos de tumores inducidos por carcinógenos o virus oncogénicos. En

humanos se han identificado algunos antígenos específicos en tumores, por ejemplo, los codificados por los oncogenes de la familia ras, que se encuentran asociados al adenocarcinoma de pulmón. Así pues, uno de los principales inconvenientes que presenta el control inmunológico del cáncer, además de la adecuada caracterización de los antígenos tumorales, es su escasa inmunogenicidad. Por ello, las actuales líneas de investigación se orientan a conseguir un aumento en la inmunogenicidad de líneas tumorales a través de diversas metodologías como el HOCl, UVB-Radiación, Congelación y descongelación y calor con la estimulación o potenciación de la respuesta inmune antitumoral (Kuman and Mason, 2012).

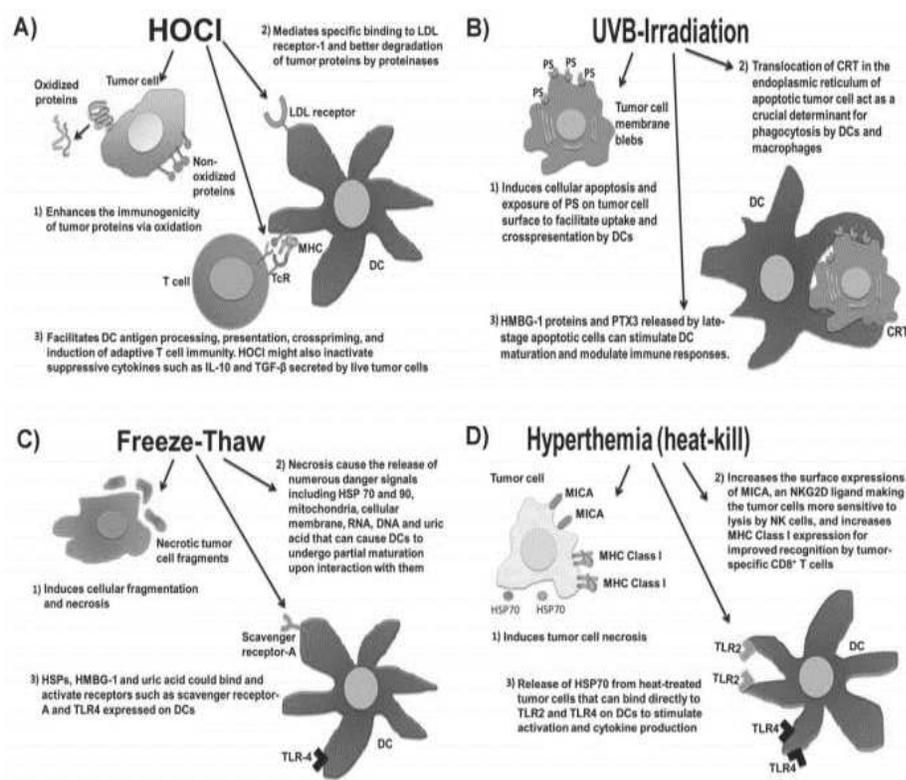


Figura 1. Metodologías para la obtención de antígenos asociados a tumor (Fotografía tomada y modificada de Pretzlet et al., 2014).

El cáncer resulta de la acumulación de mutaciones en el genoma, algunas de las cuales conducen a un crecimiento celular incontrolado y la metástasis tumoral a otros órganos. Los recientes avances en la secuenciación de nueva generación permitieron la rápida evaluación del paisaje de mutaciones en los cánceres humanos y reveló que los melanomas pueden albergar entre 100 y más de 2.000 mutaciones no sinónimas. Algunas mutaciones potencialmente podrían conducir a la expresión de las proteínas alteradas reconocidas por el sistema inmune como extrañas o no propias. Al encontrarse con péptidos presentados por moléculas de MHC en la superficie de las células diana, las células T son capaces de reconocer las diferencias de un solo aminoácido entre epítodos mutados y no mutados, proporcionando una oportunidad para el desarrollo de nuevas inmunoterapias adoptivas, con el objetivo de poder aislar células T específicas para antígenos tumorales mutados que pudieran ser administradas en pacientes con cáncer (Hunder *et al.*, 2008).

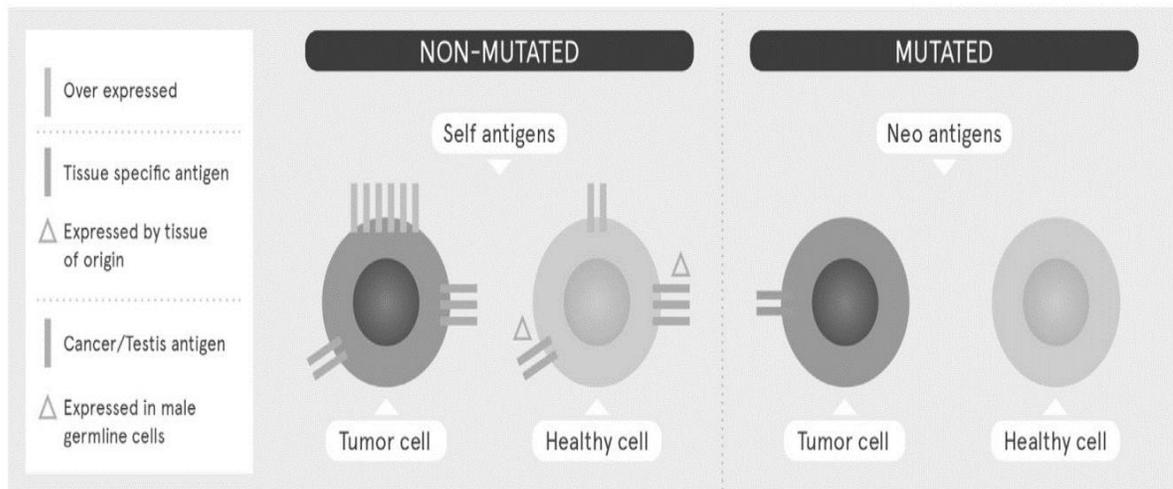


Figura 2. Antígenos específicos de tumor (Neo- antígenos) (Fotografía tomada y modificada de Cortual *et al.*, 2014).

2.3 Muerte inmunogénica

La inmunogenicidad de las células malignas ha sido recientemente publicada como un determinante crítico para la eficacia en la terapia del cáncer. Por lo tanto, además de desarrollar protocolos de inmunoestimulantes directos, incluyendo vacunas con células dendríticas, terapias de control de bloqueo (anti-PD1), y la transferencia adoptiva de células T, los investigadores han empezado a

centrarse en la inmunobiología general de las células neoplásicas (Putnam *et al.*, 2002). Ahora está claro que las células cancerosas pueden sucumbir a algunas terapias contra el cáncer al someterse a una peculiar forma de muerte celular que se caracteriza por un aumento del potencial inmunogénico de la célula, debido a la liberación de los llamados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). La liberación de DAMPS y otros factores inmunoestimuladores por las células que sucumben a la muerte celular inmunogénica (MCI) favorece el establecimiento de una fuerte respuesta inmunológica. Esto resulta en la estimulación de la respuesta inmune contra antígenos asociados a tumor con la eliminación de las células cancerosas residuales, resistentes al tratamiento, así como con el establecimiento de memoria inmunológica. Algunos ejemplos de moléculas de membrana y factores solubles que contribuyen a la maduración y activación de células del sistema inmune innato y adaptativo, la calreticulina (CRT) que es expresada en la superficie de células estresadas, la secreción de ATP, proteínas de shock de calor HSP 70 y HSP 90 y HMGB1 pasivamente liberado y su posterior interacción con los receptores de fagocitosis y esto en última instancia conduce a la activación de la inmunidad contra el cáncer potente (Meehan *et al.*, 2013).

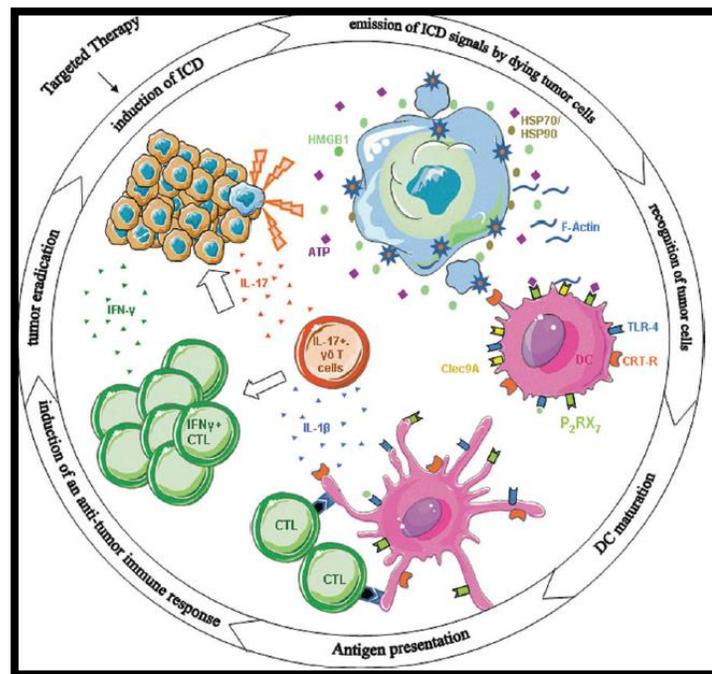


Figura 3. Patrones moleculares asociados a daño celular y la interacción con el sistema inmunológico
(Fotografía tomada y modificada de Modric *et al.*, 2010).

2.4 Células inmunes en cáncer

Se ha demostrado que las células del sistema inmune innato y adaptativo destruyen células tumorales *in vitro*. Los mecanismos de protección del sistema inmunológico se encuentran divididos en 2 grandes categorías: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (Figura 1); la primera es inespecífica y presenta componentes celulares como los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CD), eosinófilos, basófilos, células cebadas, células asesinas naturales (NK), TNK y moléculas solubles que sintetizan como citocinas y factores de la inflamación (Kees and Egeblad, 2011). El sistema inmune adaptativo es específico y se divide a su vez en respuesta inmune celular y respuesta humoral; la respuesta celular esta mediada por los linfocitos T CD4⁺ (Th1, Th2 cooperadores, Th17) y CD8⁺ (citotóxicos), esta respuesta celular llevada a cabo por las células T es la más importante en el control y regresión del cáncer, finalmente la respuesta humoral está conformada por los linfocitos B y diversos anticuerpos que son secretados por las células plasmáticas (IgA, IgG, IgE, IgM e IgD) (Inui *et al.*, 2013). La respuesta inmune innata puede activarse por la estimulación de receptores de superficie como NKG2D y TLRs por ligandos producidos por las células tumorales, como MICA, MICB, ULBP y moléculas de stress como HSP70 y HMGB1, respectivamente. Las células NK participan en la respuesta inmune antitumoral empleando varios mecanismos efectores, perforinas, FASL y producción de IFN γ , estas células tienen la habilidad de destruir células con baja expresión de MHC clase I. Ratones deficientes en NK mostraron mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores por metilcolantreno. Los linfocitos TNK son células que expresan un receptor de célula T invariante (V α 24-J α 18 en humanos y V α 14-J α 18 en ratones) y marcadores de células NK. Los TNK presentan un TCR específico para antígenos lipídicos que son expresados sobre una molécula CD1d en la superficie de una CPA o células tumorales, estas células median la destrucción tumoral a través de la producción de IFN γ que contribuye a la activación de CD8⁺ y NK con el rechazo del tumor (Sabry and Lowdell, 2013). Los macrófagos pueden ser activados a través de la unión de moléculas de stress a receptores tipo toll, resultando en la producción de especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico y citocinas inflamatorias como IFN α y TNF α . Los principales mecanismos involucrados en el rechazo tumoral son llevados a cabo por la respuesta inmune adaptativa que puede dirigir y aumentar una respuesta efectora citotóxica de tipo innata y por los linfocitos T CD8⁺. La respuesta adaptativa es iniciada por las CD que capturan células tumorales muertas, las procesan y presentan estos antígenos cargados en moléculas MHC

clase I y II a los linfocitos T en los ganglios linfáticos (Biswas *et al.*, 2008). Los linfocitos T CD4⁺ activados pueden secretar citocinas Th1 y Th2 con estimulación de la respuesta inmune celular y humoral, los linfocitos TCD8⁺ pueden ser activados por CD a través de la presentación cruzada de antígeno. La producción citocinas Th1 (IL2 e IFN γ) puede conducir a la activación y expansión clonal de linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor con destrucción de células tumorales. La producción de anticuerpos contra antígenos tumorales es detectada en individuos con cáncer, la principal función de los anticuerpos son la activación del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo por NK y macrófagos, ayudando a la regresión tumoral (Estrada *et al.*, 2002).

2.5 Vacunas contra el cáncer

Las vacunas contra el cáncer, como las vacunas convencionales que se utilizan para prevenir enfermedades infecciosas, generalmente implican la inoculación de un paciente con un reactivo diseñado para inducir una respuesta inmune específica de antígeno. En el caso del cáncer, los virus oncogénicos son un blanco ideal para vacunas de prevención contra el cáncer, como la del VPH, que previene el cáncer de cuello de útero. Sin embargo, las vacunas terapéuticas, tienen como objetivo tratarlo después del diagnóstico. Éstas incluyen técnicas simples basadas en la inoculación de células tumorales muertas o antígenos tumorales identificados y purificados, o vacunas complejas como células dendríticas del propio paciente estimuladas con antígenos tumorales y seleccionadas, o bien células dendríticas que expresan, en su interior, antígenos propios tumorales. Estas DC actuarán específicamente para activar el sistema inmunitario contra los antígenos del tumor (McLaughlin *et al.*, 2001). La idea de obtener una vacuna contra el cáncer es tan antigua como la propia inmunología, y se basa en el concepto de inmunovigilancia o vigilancia inmunológica propuesto por Burnet. Esta teoría sugería la existencia de una proporción relativamente grande de células que continuamente se están transformando en células tumorales, expresando nuevos antígenos que permitirían al sistema inmunitario reconocerlas como extrañas y eliminarlas. No obstante, la interacción tumor-individuo es bastante más compleja. Así pues, la existencia de variantes celulares con diferente capacidad inmunogénica, así como la implantación del sistema inmunitario inespecífico o la capacidad de las células tumorales para evitarlo dificultan las posibilidades de la inmunología tumoral en el campo de la oncología clínica. La inmunoterapia anticancerosa se basa en el control del crecimiento tumoral mediante la activación del sistema inmunológico (Ramos *et al.*, 2012). La activación de una respuesta

antitumoral específica será consecuencia de la expresión por las células cancerosas de nuevos antígenos, denominados tumor-específicos o tumor asociados. Por tanto, en inmunología una vacuna constituye el modo de mostrar un antígeno al sistema inmune, de tal forma que éste lo reconozca como extraño y provoque una respuesta inmunitaria hacia todas aquellas células que lo expresen. La identificación de los antígenos tumorales es, por tanto, fundamental para el desarrollo de las distintas vacunas. El desarrollo de las vacunas antitumorales se fundamenta en tres características básicas del sistema inmunitario; La existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de los antígenos entre la mayoría de las células no cancerosas y cancerosas (Perou *et al.*, 2000). El sistema inmunológico es potencialmente capaz de detectar estas diferencias, iniciando la respuesta inmune a través de los linfocitos T citotóxicos. La respuesta inmunitaria es capaz de producir la regresión tumoral. Por otra parte, el sistema inmune es capaz de aprender, mediante la inmunización activa específica a reconocer estas diferencias y provocar una reducción de la masa tumoral. Sin embargo, y como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de los antígenos tumorales presentan una escasa inmunogenicidad, de tal forma que es necesario diseñar estrategias capaces de potenciar este aspecto y poder conseguir una respuesta inmune efectiva. Para ello se ha recurrido a la conjugación del antígeno tumoral con adyuvantes (adyuvante completo o incompleto de Freund, aluminio, liposomas, etc.) de alto poder inmunogénico. Los adyuvantes no necesariamente necesitan hallarse unidos físicamente al antígeno, es el caso del levamisol, el interferón gamma, el sargramostin o la BCG (Waldmann, 2006).

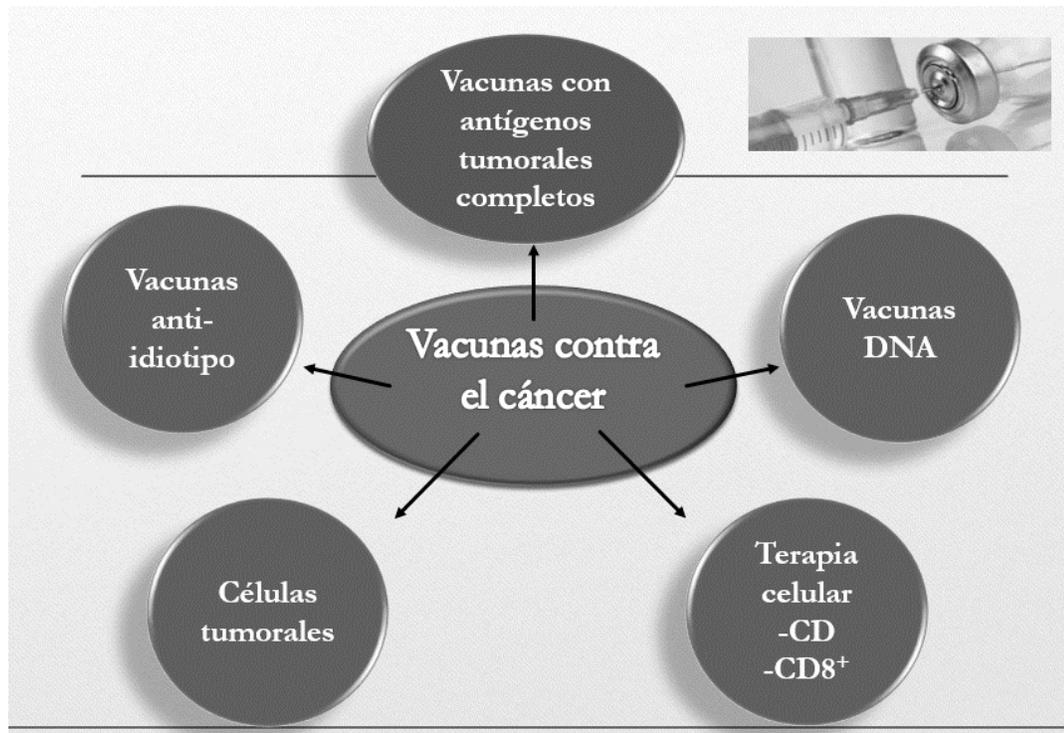


Figura 4. Vacunas contra el cáncer específicas de tumor (Fotografía tomada y modificada de Gullet et al., 2010).

2.6 Lisado tumoral completo

El antígeno tumoral completo representa una gran cantidad de epítomos caracterizados y no caracterizados disponibles para la activación de los linfocitos T Cooperadores ($CD4^+$) y linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) contribuyendo como una fuente múltiple y atractiva de antígenos o péptidos derivados del tumor. Aunque hoy en día es relativamente fácil de sintetizar grandes cantidades de péptidos asociados a tumor (gp100, SMART1, Wt1, etc.) para su uso clínico en inmunoterapias, la mayoría de los péptidos identificados al momento presentan restricción por HLA -A2 lo que significa que la mayoría de pacientes positivos HLA-A2 son beneficiados de esta forma de tratamiento, pero los demás no. Sin embargo, la respuesta inmune en pacientes con cáncer limitada a un solo péptido para la inmunización podría ser insuficiente para controlar el crecimiento del tumor, dando lugar a la tumorigénesis y metástasis del mismo (Kees and Egeblad, 2011). Las células tumorales con frecuencia experimentan elevadas tasas de mutación que podría resultar en la pérdida

de un único o múltiples antígenos, por lo cual sería ideal poder obtener una fuente de antígeno múltiple que puede provocar una amplia respuesta específica de tumor policlonal dirigido contra múltiples epítomos antigénicos. El antígeno tumoral completo ofrece una gran ventaja ya que permite a las DCs procesar y presentar numerosos antígenos específicos de tumor para estimular una fuerte respuesta celular policlonal de tipo T, logrando evitar el escape del tumor. Por otra parte, el tratamiento con el lisado tumoral completo autólogo o alogénico de células es adecuado para todos los pacientes con cáncer independientemente de su haplotipo de HLA (Nerosid *et al.*, 2014). Es bien conocido la pobre inmunogenicidad de las células tumorales, las vacunas actuales antitumorales sintetizadas a base de células tumorales alogénicas tienen como objetivo el incrementar las propiedades inmunogénicas propias de la vacuna, exponiendo las células tumorales a modificación oxidativa, con el uso del ácido hipocloroso. Se puede obtener una buena respuesta inmunogénica utilizando una mezcla de hasta 5 diferentes líneas celulares alogénicas de cáncer preparadas para lisado tumoral. Utilizar una mezcla de líneas celulares presenta una gran ventaja para el uso de antígenos asociados a tumor o péptidos únicos, debido a la gran variedad de péptidos presentes en los lisados tumorales, previniendo el escape del tumor. Un punto importante son las muestras de tumor seleccionadas para lisados celulares, en teoría estos tejidos deberían presentar gran de infiltración de células efectoras y de memoria (alta inmunogenicidad) y poca expresión de células positivas para FoxP3 fenotipo T regulador (pobre inmunogenicidad), logrando obtener antígenos tumorales para pulsar a las células dendríticas y obtener una fuerte respuesta inmune, evitando la presencia de factores derivados de tumor con una acción inmunosupresiva (Ezqueda *et al.*, 2008).

2.6.1 Ácido hipocloroso

El ácido hipocloroso (HOCl), se clasifica dentro del grupo de moléculas denominadas especies reactivas del oxígeno sintetizado por macrófagos y neutrófilos, es una molécula clave en la inflamación aguda y la inmunidad innata durante un proceso inmunológico conocido como estallido respiratorio, durante la fagocitosis de antígenos en reacción con la enzima mieloperoxidasa, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y un ion de cloro. (Thomas, 1979). El HOCl está involucrado en destrucción bacteriana dentro de los fagolisosomas. El HOCl es un oxidante reactivo y puede reaccionar con una variedad de sustancias en los sitios de inflamación incluyendo las proteínas las cuales puede modificar. La modificación oxidativa de proteínas con el HOCl se

caracteriza por la cloración de los grupos amino o cadenas laterales de histidina, lisina y arginina para formar mono- y di-cloraminas. Estas cloraminas muestran más débil actividad oxidante. Las cloraminas formadas en estas reacciones se convierten posteriormente en aldehídos libres. Principalmente triptófano, tirosina, cisteína y metionina actúan como blancos de la clorinación por el HOC. *In vitro* ha sido reportada la modificación de los antígenos proteicos con aumento de la inmunogenicidad, el HOCl permite una mayor degradación de los antígenos que son modificados y captados por la células dendríticas, presentando péptidos cargados en las moléculas del MHC con la activación de los linfocitos T, el HOCl también lleva a cabo la inactivación de moléculas reguladoras como TGF β e IL-10 inhibiendo vías supresoras de la respuesta inmune (Hawkins and Davies, 2005). Los antígenos tumorales completos a diferencia de los péptidos únicos y proteínas derivadas de tumores, podrían representar la fuente ideal para estimular a las DC, ya que contienen una gran variedad de epítomos inmunogénicos para activar ambos linfocitos TCD4⁺ y CD8⁺ específicas del tumor para evitar el escape del tumor. El aumento de la inmunogenicidad de las proteínas de tumor oxidadas con HOCl se debe a una serie de mecanismos, incluyendo la unión específica de proteínas oxidadas a lipoproteínas de baja densidad (LDL), es decir, receptores de activación en las células dendríticas (DCs), mayor degradación de proteínas oxidadas por proteinasas, la mejora continua de procesamiento y presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), presentación cruzada de células T específicas de tumor (CD8⁺) a través del receptor de células T (TCR). Se ha demostrado que el HOCl también puede inactivar la IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF) - β que pueden inhibir las respuestas anti-tumorales y facilitar la proliferación de células T reguladoras (Weiss, 2007).

2.6.2 Maduración de las Células Dendríticas

Las células dendríticas (CD) son las más potentes células presentadoras de antígeno que procesan y expresan en una molécula del MHC péptidos a los linfocitos T. La recolección de células dendríticas de tejidos periféricos y linfoides no es una técnica viable y practica para su cultivo. Se ha demostrado con el empleo de monocitos marcados con moléculas fluorescentes que estos migran al tejido linfoide y son capaces de diferenciarse en células dendríticas funcionales, por lo que la habilidad de estos monocitos para diferenciarse *in vitro* a células dendríticas bajo ciertas condiciones microambientales es un hecho (Tanaka *et al.*, 2000). Las CD se clasifican en 3

subtipos con características de fenotipo particular: las CD intersticiales, localizadas en piel y órganos linfoides, las CD de linaje plasmocitoide (CD11⁻ CD8⁺) y las CD de linaje mielóide (CD11⁺ CD8⁻) ambas localizadas en circulación. Una función primaria de las CD es vigilar en el medio celular la presencia de patógenos y células tumorales, por lo cual se convierten en un importante centinela del sistema inmune. Las CD son miembros del sistema inmune innato y estas células empiezan la cascada inmunológica que activa la respuesta inmune adaptativa (Granados and Delgado., 2008). Las CD llevan a cabo el procesamiento y presentación de antígeno a las células T, por la vía del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II que activa a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ respectivamente, por lo cual se produce una respuesta inmune antígeno específica. Son capaces de procesar antígenos exógenos y endógenos, captándolos por fagocitosis, pinocitosis y endocitosis. También inducen la diferenciación de los linfocitos B de memoria en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Una función de las CD es su capacidad para activar a las células NK en el sistema inmune innato (Rescigno *et al.*, 2007). En los años noventa se encontró la posibilidad de generar grandes cantidades de CD *in vitro* a partir de precursores monocitos, obteniendo células mononucleares de sangre periférica (PBMC) e incubando en RMPI en presencia de 1000 U/mL de GM-CSF y 500 U/mL de IL-4 durante, dichas células pueden ser utilizadas en terapia autóloga del cáncer.

2.7 Microambiente inmunosupresor

Es bien conocido el estado de inmunosupresión en pacientes con cáncer, es por esto que la estrategia de inmunoterapia debe ser implementada con base en el tipo de tumor y microambiente tumoral, ya que la estimulación del sistema inmune puede verse afectado por diferentes factores asociados a tumor (Ochsenbein *et al.*, 1999). Sin embargo la radioterapia, quimioterapia y la edad del paciente también pueden afectar la estrategia de inmunoterapia. Las interacciones complejas entre los diferentes tipos de células y el microambiente tumoral regulan el crecimiento tumoral, progresión, metástasis y angiogénesis. El microambiente tumoral es considerado inflamatorio, por lo que la activación del sistema inmune innato (macrófagos y otros) juega un rol importante en la progresión del tumor (Harimoto *et al.*, 2013). Algunos estudios han descrito factores secretados por tumores implicados en la disfunción de las células presentadoras de antígenos. IL-10, VEGF y TGFβ están relacionados con la inhibición en la diferenciación de las CD por supresión de la actividad de NF-

κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas) a partir de precursores mieloides. También factores solubles del tumor como TGF β , IL-1 β , IL-12, PG y ROS permiten la diferenciación de precursores mieloides en células con actividad inmunosupresora MDSC (CD11b, Gr-1 CD14-/+, CD15, CD33) que producen inactivación y anergia de linfocitos T efectoros y expansión de los T reguladores vía IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) y arginasa (Yu et al., 2013), otros factores asociados al tumor que participan en la inhibición de la maduración de CD son TGF β , ácido láctico, COX-2 y PGE2 (Hargadon, 2013). Finalmente *in vivo* las células dendríticas maduras, inmaduras, precursores linfoides y mieloides de pacientes con cáncer pueden ser transformadas en células dendríticas reguladoras mieloides (CD11c, B7-H1, B7-DC) y reguladoras plasmocitoides (CD19, B220/CD45R BDCA-4) por secreción de factores tumorales y membranales como TGF β , PGE2, CCL2, CXCL1, CXCL5, IL-6, IL-10, TNF α e IFN α (Wang *et al.*, 2013), por lo tanto estas células reguladoras producen una disfunción y depleción de las APC con disminución e inhibición de los linfocitos T efectoros (CD4⁺ y CD8⁺) supresores de tumor y aumento los T reguladores (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺) que secretan IL-10 y TGF β suprimiendo la actividad citolítica de los CD8⁺ específicos de tumor con la consecuente formación de un microambiente tumoral con actividad inmunosupresora que permite la evasión del sistema inmune y progresión del tumor (Steinman, 2012). Hay evidencia que sugiere que en el microambiente tumoral también existe una población de células que participan en la progresión del cáncer, un subtipo denominado macrófagos asociados a tumor (TAM) con fenotipo CD11b, CD206, CD68, CD163 (Liu *et al.*, 2009) que está relacionado con un pobre pronóstico para el paciente. Este subtipo celular expresa un perfil parecido con los macrófagos activados por la vía alternativa (M2), llevando a cabo la secreción de IL-10, TGF- β (implicadas en la diferenciación de Th2 y Tregs), presencia de receptores de manosa, arginasa, VEGF (angiogénesis), HIF, ROS y baja expresión de IL-12, esta población es diferenciada por factores asociados a tumor como IL-10. Por lo tanto el microambiente tumoral influye en el sistema inmune innato y adaptativo por lo que debe de ser considerado durante la selección del protocolo de inmunoterapia (Tang, 2013).

2.8 Cáncer transmisible

2.8.1 Tumor Venéreo Transmisible Canino

El Tumor Venéreo Transmisible Canino (TVT) también conocido como linfosarcoma transmisible, sarcoma infeccioso, tumor de Stiker o granuloma venéreo es una enfermedad tumoral genital que se presenta en perros (*Canis familiaris*) de ambos sexos (Kennedy *et al*, 1977). Aunque de manera experimental puede ser transmitido a miembros de la familia canidae como coyotes, lobos y zorros. Se describió por primera vez en 1876 por Nowinsky como un tumor cuya transmisión ocurre por trasplante de células tumorales viables entre perros durante el contacto físico-sexual (Harmelin *et al.*, 2002). Tumor venéreo transmisible (TVT) es conocido por ser un tumor inusual, con una característica transmisión diferente al resto de los tumores hasta la fecha estudiados, su propagación clonal ha perdurado desde su origen (250-2500 años atrás), junto con la enfermedad tumoral facial del demonio de Tasmania (DFTD) que afecta a miembros de la especie *Sarcophilus harrisii* son los únicos tumores llamados cánceres contagiosos no inducidos por microorganismos (Murchison, 2009), ya que pueden trasplantarse entre todos los individuos de su respectiva especie sin importar el haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) entre el donador y receptor (Hsiao *et al.*, 2002). Por lo tanto desde su descubrimiento científicos alrededor del mundo se han dado a la tarea de utilizar el TVT como un modelo popular de estudio del cáncer; enfocándose principalmente en los mecanismos de evasión utilizados por el TVT para escapar de la vigilancia del sistema inmunológico y estudios de trasplante de tumor antes del desarrollo de modelos singénicos de roedores, aunque para tener más de un siglo de haberse descrito, hoy en día su naturaleza de propagación clonal entre individuos y rompimiento de las reglas de la barrera conocida como MHC es pobremente entendido (Siddle and Kaufman, 2013), sin embargo, algunos autores apoyan esta teoría de la transmisión clonal del cáncer, donde proponen que el TVT es causado por la propia célula cancerígena que es trasplantada e implantada en el nuevo individuo, es decir, la misma célula tumoral es el agente infeccioso que se desarrolló como un parásito y adquirió la capacidad de poder ser transmisible, siendo el único tumor que puede ser trasplantado entre individuos de la misma especie superando la barrera del complejo mayor de histocompatibilidad (Mukaratirwa and Gruys, 2003). Por el contrario otros investigadores sugieren que el TVT tiene causa viral, ya que en estudios con células neoplásicas de TVT han encontrado la presencia de partículas virales de la familia del

papilomavirus (Allejo and Gimbo, 1965), este tema todavía presenta controversia, por lo que el agente etiológico es aún desconocido.



Figura 5. Tumor Venéreo Transmisible canino en el órgano genital de un macho (Fotografía tomada y modificada de Ramírez et al., 2010).

La distribución del TVT es mundial, ha sido reportado en los cinco continentes y no tiene predisposición alguna, ya sea por raza o sexo dentro de la especie canina, pudiendo estar en mayor riesgo aquellos canidos que han pasado la etapa de madurez sexual y que están en constante contacto físico, se presenta con alta prevalencia en regiones tropicales, considerada endémica de estas zonas, encontrándose principalmente en poblaciones de canidos de vida libre (Chiang *et al.*, 2012). La exfoliación y trasplante de células es su principal forma de transmisión. Naturalmente su propagación ocurre entre canidos a través del contacto sexual (coito), sin embargo, también se menciona el contagio del tumor por mordeduras, lamidos o rascados de zonas infectadas por individuos susceptibles. La implantación del tumor se ve facilitada por la presencia de cualquier lesión en la mucosa o pérdida de su integridad. TVT presenta una localización predominante en las membranas mucosas de órganos genitales (Figura 3); la base del pene en machos y vestíbulo de la vagina en hembras, también se ha reportado metástasis en cachorros o perros inmunocomprometidos hacia regiones extragenitales como ojo, nariz, pulmón, hígado, cerebro, piel, bazo y ganglios linfáticos cercanos al tumor (Ramírez *et al.*, 2010).

Por otro lado de manera experimental el TVT presenta un comportamiento de crecimiento característico conformado por 3 etapas que culmina con su regresión espontánea a partir de las diecisiete semanas después de su inoculación; primero con una fase de crecimiento progresivo con duración de doce semanas, una fase estática sin disminución o crecimiento alguno (cinco semanas) y una fase de regresión tumoral que se presenta después de la semana diecisiete post-inoculación con un período de duración de dos a doce semanas, conociendo poco del mecanismo celular y molecular que conlleva a su regresión espontánea, sin embargo, no hay reportes que concluyan con datos, cifras o frecuencias sobre la aparición de una u otra forma de presentación: metastásica o de regresión espontánea del TVT en la naturaleza, aunque se cree que la aparición de una forma de presentación o la otra dependa del estado del sistema inmunológico (Linfocitos infiltrantes de tumor y citocinas, respuesta humoral), por ejemplo la metástasis aparece en perros irradiados o cachorros recién nacidos inoculados experimentalmente, o contrario aquellos individuos que se han recuperado de la enfermedad son protegidos frente a la re-infección, también se ha observado menor susceptibilidad a la enfermedad en cachorros cuyas madres estuvieron expuestas al TVT (Salamanca *et al.*, 2008).

2.8.2 Histología del TVT

El TVT es un tumor con rara mortalidad, que responde de manera eficiente a protocolos de quimioterapia (90% efectividad) (sulfato de vincristina 0.5-0.7mg/m², cada semana por 2-8 semanas) y radioterapia, sin embargo, puede haber un 58-68% de recurrencia en los casos tratados (González *et al.*, 2000). El periodo de incubación es de 15-60 días después de su inoculación, puede crecer lentamente o ser rápidamente invasivo. El TVT es un tumor de órganos genitales vulva y pene de los canidos (presencia de descarga vulvar y prepucial). En la clínica se puede describir al tumor del TVT con la apariencia de una coliflor con un diámetro 10 cm o más, conformada por múltiples pequeños nódulos que pueden observarse a partir de los 15 días-6 meses después del contagio, la masa presenta una apariencia friable y coloración rojiza de la cual se desprende sangre de manera constante que fluye al exterior de la vagina o pene, siendo un signo clínico típico del TVT que puede ser confundido en hembras con la etapa de celo, en muchas ocasiones el tumor puede estar combinado con infecciones secundarias oportunistas que le dan a la zona genital una apariencia blanquecina y exudativa. En el macho puede aparecer como signo clínico la fimosis del pene (De la

Sota *et al.*, 2000). Al análisis microscópico (Figura 4) se observa un cultivo de células con forma de redonda a poliédrica, con un núcleo central y prominente nucléolo, 1 o 2 nucléolos, el citoplasma es ligeramente granular, con presencia de vacuolas y eosinofílico, sin embargo, se han descrito 2 tipos de células en las diferentes etapas de TVT (progresión y regresión), en la primera con apariencia redonda y microvellosidades y en la etapa de rechazo con apariencia fusiforme. Al análisis histopatológico TVT es un tejido homogéneo cuyas células crecen con frecuencia en hileras. Como se comentó al principio el TVT no tiene predisposición por el sexo, pero algunos autores mencionan mayores casos de metástasis en hembras que en machos, sugiriendo sensibilidad hormonal, mientras que otros manifiestan mayor predisposición en machos. En perros con TVT con tumores voluminosos se puede observar en agrandamiento de ganglios linfáticos regionales (Harmelin *et al.*, 2002).

2.8.3 Genética del TVT

Los genes DLA (Dog leukocyte antigens) clase I y clase II en el perro (complejo mayor de histocompatibilidad) son altamente polimórficos. Genes clase I: DLA12, DLA79, DLA88 y DLA64. Genes clase II: DLA-DRB1, DLA-DQA1, DLA-DQB1 y DLA-DRA1. Hasta la fecha han sido reportadas, 100 DLA-DRB1, 18 DLA-DQA1 y 47 DLA-DQB1 secuencias alélicas para clase II. DLA 88 clase I es el más polimórfico clase I, 51 alelos han sido identificados (Wagner *et al.*, 2000). El TVT se clasifica en el grupo de tumoraciones de células redondas junto con los linfosarcomas, mastocitomas e histiocitomas. El cariotipo aneuploide del TVT a través de los años ha permanecido estable, se analizaron perros de Europa, Asia, América, Sudamérica y África y todos presentaron 57-59 cromosomas difiriendo con las 78 cromosomas presentes en las células normales del perro, este cariotipo incluye 15-17 cromosomas metacéntricos difiriendo de los 2 cromosomas metacéntricos del perro, estas similitudes encontradas en todas las muestras procedentes de los 5 continentes sugieren un origen común del TVT (Bridgett and Ostrander, 2006). La hipótesis de que el TVT es causado por la propia célula que puede ser trasplantada como un aloinjerto se basa en estudios en los cuales se analizaron microsatélites, DNA mitocondrial y el locus del complejo mayor de histocompatibilidad del perro (DLA) y de una célula con TVT. Un dato importante es que el tumor solo puede ser trasplantado por células viables de TVT y no por células muertas o filtrados celulares, como se mencionó antes el cariotipo aneuploide de 59 cromosomas se mantiene en todas las muestras tomadas de distintas partes del mundo, un marcador utilizado como diagnóstico

molecular de TVT es la inserción de LINE 1 (transposable genetic element sequence) cerca del oncogen Myc-c (5' primer exón) se ha encontrado en todos los especímenes analizados hasta la fecha, pero que no se encuentra en las células normales del hospedador, todas estas características sugieren que el agente causal del TVT es la misma célula Murgia *et al.*,2006). Mukaratirwa and Gruys, 2003 mencionan resultados similares analizando muestras de TVT de Francia, Jamaica, Japón, Kenia, Nigeria, Uganda, URSS y EUA, mismo número de cromosomas en todos los tumores (59 cromosomas), misma frecuencia de cromosomas metacéntricos, esto se mantiene después de varios pasajes *in vitro* e *in vivo*. El número de cromosomas se mantiene en el lugar primario y durante la metástasis a tejidos distantes (cerebro). Rearreglos del ADN que se mantienen en todos los tumores (Line 1 cerca de c-Myc). Incluso en un modelo de xenoinjerto de TVT, en ratones SCID, las células tumorales de TVT retienen las características antes mencionadas. En un análisis de comparación con muestras de TVT de diferentes países, se evaluó el DLA (4 genes) de los hospedadores con tumor y los genes del MHC de la célula de TVT y se mostró que en todos los casos el DLA (MHC clase I los exones 2 y 3 DLA88, MHC clase II exón 2 de DRB1, DQB1, DQA1) de todas las muestras el haplotipo del hospedador y de la célula de TVT era diferente, pero se confirmó que haplotipo de todos los tumores era el mismo. Se llevó a cabo la amplificación por PCR de 21 microsatélites que están dispersos en diferentes cromosomas en la célula normal del perro y se compararon en 11 perros de 5 los continentes las secuencias del tejido normal y las secuencias del tejido afectado con TVT, mostrando que los tumores y el tejido normal están genéticamente separados, logrando agrupar todas las muestras tumorales y presentando similitudes genéticas las neoplasias evaluadas de los 5 continentes (Chianga *et al.*, 2013).

Algunos autores han propuesto que debido a la diferencia marcada en el DLA y secuencias de microsatélites entre el perro y el TVT este último puede que presente un origen diferente a su hospedador, el alelo DQB1 ha sido reportado en el lobo gris (*Canis lupus*) de Norteamérica y DQA1 ha sido reportado en perros de Asia (Huskies), el TVT presenta 2 alelos no descritos en el DLA del perro: DLA88 y DRB1 que están relacionados en el lobo gris y con perros de Asia, este análisis de DLA sugiere que el origen del TVT está en el *Canis lupus* o algunas cruces de razas antiguas de perros de Asia (Figura 6) y que todos los tumores en la actualidad de TVT datan de una célula ancestral común que surgió hace 250-2500 años (Murgia *et al.*,2006). (Choi and Kim, 2002) demostraron una mutación del gen *p53* a nivel del codón 316 (posición de nucleótido 964 de una T

a una C, una mutación en este punto cambia el aminoácido codificado de fenilalanina a serina) en la célula de TVT, sugiriendo ser la razón etiológica del TVT. Sin embargo, recientemente (Vásquez-Mota *et al.*, 2008) han demostrado que esta mutación pudo ser adquirida en un estadio tardío del origen clonal del TVT. Además, argumentan que dada la alta mutabilidad de este gen se pueden generar diversas variantes genéticas del TVT en diferentes partes del mundo. Las proteínas de shock térmico son moléculas relacionadas con el stress celular, etapa en la cual son abundantes, ejemplos de estas son HSP60, HSP70, HSP90 y HMGB1 que activan a macrófagos y células dendríticas a través de los TLR (receptores tipo Toll) y estimulan la secreción de IL-12. Algunas células tumorales son caracterizadas por la liberación de moléculas de stress (melanoma, carcinoma renal), TVT es caracterizado por la secreción de HSP60, HSP70 por lo cual se puede utilizar estas proteínas como marcadores moleculares ya que en tejidos normales del hospedador la presencia de ambas proteínas son indetectables, HSP60 está relacionada con la etapa de regresión tumoral.

Las células de TVT son termoresistentes por lo cual esta característica puede estar conferida por HSP60 y HSP70. Con base en las proteínas de shock térmico en TVT, esta puede ser utilizada como antígeno para el desarrollo de vacunas a base de ADN xenogénico (Chu *et al.*, 2001). Mayor cantidad de linfocitos infiltrantes de tumor, moléculas de MHC II y anticuerpos son detectados en la fase de regresión tumoral del TVT comparado con la fase de progresión tumoral en la cual la cantidad de TIL es menor, esto fue confirmado en un estudio de inmunohistoquímica en el que se evaluó la presencia de linfocitos T CD3, linfocitos B (CD79), macrófagos (L1), subclases de IgG2, IgG3, IgG4 y MHCII utilizando anticuerpos específicos, obteniendo como resultado que el número de células y moléculas reactivas fue más alto en la etapa de regresión tumoral ($p < 0.05$), sugiriendo que estas células y moléculas están implicadas en el proceso de rechazo del TVT, con la participación de macrófagos, linfocitos T en conjunto con (linfocitos B) células plasmáticas productoras de IgG2, IgG3, IgG4 (vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) (Perez *et al.*, 1998). En un estudio de 14 casos de TVT se emplearon diferentes anticuerpos monoclonales para una variedad de antígenos de superficie y citoplasmáticos, encontrando reactividad al antígeno ACM1 en 11 de 14 casos (sistema fagocítico mononuclear), lisozima en todos los casos (histiocito), enolasa neuronal específica en 11 de 14 (neuronas y células de schwann), vimentina en 10 de 14 (células mesenquimales), proteína ácida glial fibrilar (4 de 14) y desmina (1 de 14), sugiriendo un origen histiocítico (Marchal *et al.*, 1997). También se ha reportado la presencia del marcador A-1

antitripsina en células de TVT (Mukaratirwa and Gruys, 2003). Los antígenos MHC se expresan en muy bajo porcentaje en células de tumor venéreo transmisible, por lo que esta característica puede llevar a cabo con éxito el trasplante tumoral en perros adultos inmunocompetentes. En la fase 1 de progresión las células tumorales carecen ambas clases de MHC, pero en la fase de regresión las células expresan de un 30-40% de MHC de ambas clases, por lo que esto puede producir una respuesta inmune adicional que permita el rechazo del tumor (Pérez *et al.*, 1998). El TVT de forma experimental es caracterizado por una fase de rápido crecimiento (Progresiva, P) que ocurre después de la implantación de las células viables sobre la mucosa epitelial, durante la cual solo un pequeño porcentaje de células 1-3% presentan moléculas del MHC clase I y MHC clase II sobre su superficie plasmática, algunos tumores llevan a cabo el silenciamiento de genes relacionados con el procesamiento del antígeno como TAP 1 y 2, LMP 2 y 7, calnexina, $\beta 2$ microglobulina o cadenas de MHC, por lo cual no pueden ser formadas las moléculas del MHC o estas no pueden exponerse de manera estable en la superficie celular (Hsiao *et al.*, 2002), esto trae como resultado la evasión del sistema inmune que no puede reconocer al CTVT como aloMHC y llevar a cabo su rechazo debido a la poca cantidad de las moléculas de histocompatibilidad en células tumorales por lo cual la inmunidad adaptativa por medio de los linfocitos TCD8⁺ son incapaces de montar una respuesta de citotoxicidad, por otro lado algunos investigadores han relacionado la secreción de TGF- $\beta 1$ por parte de las células tumorales tanto en la etapa de progresión como en la etapa de regresión (R), TGF- $\beta 1$ es reconocida por sus efectos reguladores del sistema inmune, inhibición de generación de células dendríticas a partir de monocitos, inhibición de la actividad de NK y células LAK, disminución de la maduración y proliferación de timocitos y células B, mayor apoptosis de NK y menor transcripción de Bcl-2 (Liao *et al.*, 2003). Sin embargo, la citocina inmunosupresora TGF- β estaría relacionada con el bloqueo de las células del sistema inmune innato NK (natural killer), estas tienen como blanco la lisis de células que expresan bajas cantidades de MHC en la superficie, por lo cual la disminución de expresión de MHC clase I y II aunado a la secreción del TGF- β son necesarias para escapar de la inmunovigilancia por parte del tumor manteniendo un estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral y conllevando a una ineficacia por parte de la inmunidad innata y adaptativa en esta etapa de progresión tumoral, se ha investigado la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en las etapas del TVT (Hsiao *et al.*, 2004), sugiriendo la presencia de CD5⁺/CD25⁺ reguladores en la etapa de crecimiento tumoral. La etapa antes mencionada es seguida por una fase de estasis tumoral (S) la cual se caracteriza por no haber

crecimiento ni disminución del tamaño tumoral, con una duración de 5 semanas. En algunos casos el rechazo de tumor se lleva a cabo de manera espontánea, etapa de regresión (R), la principal característica de esta fase es el aumento de moléculas del MHC clase I y II en la superficie de las células (40%), la secreción de TGF- β es sostenida aquí también, se ha demostrado la presencia de subpoblaciones de TIL (CD4⁺, Th1) secretadores de citocinas neutralizantes de TGF- β , como la IL-6, que estaría relacionada de manera indirecta y sinérgica en el funcionamiento y actividad del IFN γ sobre las células tumorales con aumento de expresión de MHC clase I y II, activación de macrófagos, cambios de subclase de IgG por linfocitos B y mayor diferenciación a Th1, también se ha reportado la presencia de IL-15 que presenta un papel crítico que conduce a la activación de células NK y manteniendo la actividad antiapoptótica Bcl-2, por lo tanto se atribuye el rechazo del tumor a la vía linfocitos T CD8⁺ y células NK, aunado a una respuesta humoral, participando en conjunto la inmunidad adaptativa e innata. Se ha demostrado que la IL-6 es una importante molécula iniciadora de la reversión tumoral que participa en la transición de la etapa de progresión hacia regresión, algunos genes involucrados en la activación de la IL6 por los TIL son PLTP que participa como mediador de la inflamación, GPNMB (expresado en células dendríticas participando también en la diferenciación a Th2) y TIMD-4 secretado por células T y macrófagos. Algunos autores mencionan en la etapa de regresión la presencia de células Th17 que están implicadas en patologías autoinmunes y que son generadas en presencia de IL-6 y TGF- β , los genes expresados por Th17 fueron detectadas mediante RT-PCR amplificando IL-17C, IL-17A e IL-21 por lo que las Th17 pudieran también participar en el rechazo del TVT (Hsiao *et al.*, 2008 c). Las células dendríticas participan en la respuesta inmune innata y adaptativa, teniendo un papel crítico en la presentación de antígenos específicos de tumor e inicio de la respuesta inmune por los linfocitos T. TGF- β 1 es un factor secretado por TVT que participa en disminución de maduración de células dendríticas (CD) a través de menor expresión de CD1a, CD40, CD83, CD86, CD80 y MCH II sobre la superficie de estas, con una consecuente baja habilidad para llevar a cabo sus funciones. Se ha encontrado relación en la expresión de IL-6 con la restauración de la actividad funcional de CD, atribuido al bloqueo de translocación del factor nuclear Smad 2/3 en célula dendríticas (Lin *et al.*, 2013). En un estudio se evaluó en sangre periférica la población de linfocitos B y anticuerpos después de la inoculación con el tumor, en etapa de progresión y regresión de TVT, la proporción de linfocitos B decreció después de la inoculación con TVT, lo mismo ocurrió con la concentración de anticuerpos, después de la regresión tumoral los linfocitos B y anticuerpos retornaron a sus niveles normales, se reportó la

presencia de una molécula citotóxica sensible al calor proteinasa K que destruye los linfocitos B de sangre periférica (Liao *et al.*, 2003). El suero de perros en fase de crecimiento tumoral inhibió la respuesta de linfocitos a células viables de TVT, sin embargo el suero de perros en fase de regresión tumoral mostró mayor actividad del sistema inmune inhibitoria contra células de TVT, sugiriendo la participación de la respuesta humoral *in vivo* en el rechazo de TVT, por lo cual una manera de evadir la respuesta inmune por parte del tumor es la depleción de linfocitos B con disminución en la concentración de anticuerpos para prevenir su rechazo (Chang and Yeung, 2003).

3. HIPOTESIS

La vacunación con el lisado tumoral del TVT en caninos sanos estimula la respuesta inmune antitumoral previniendo la tumorigenesis inducida por el TVT.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

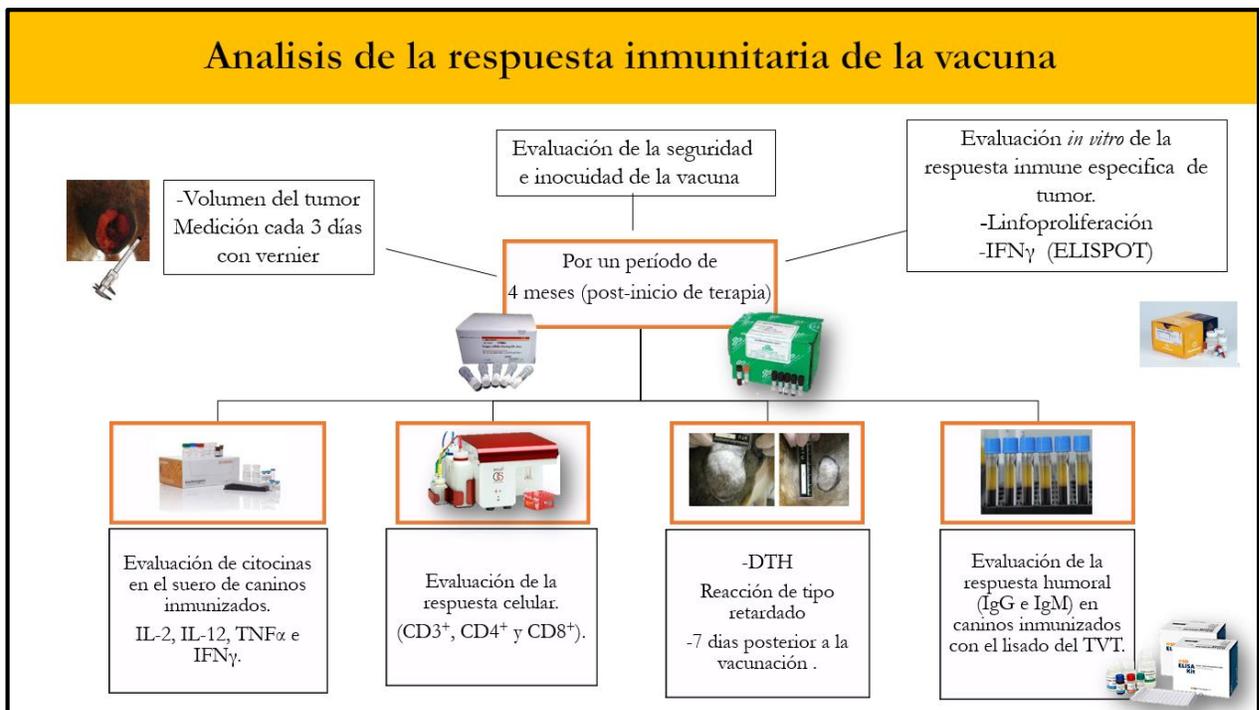
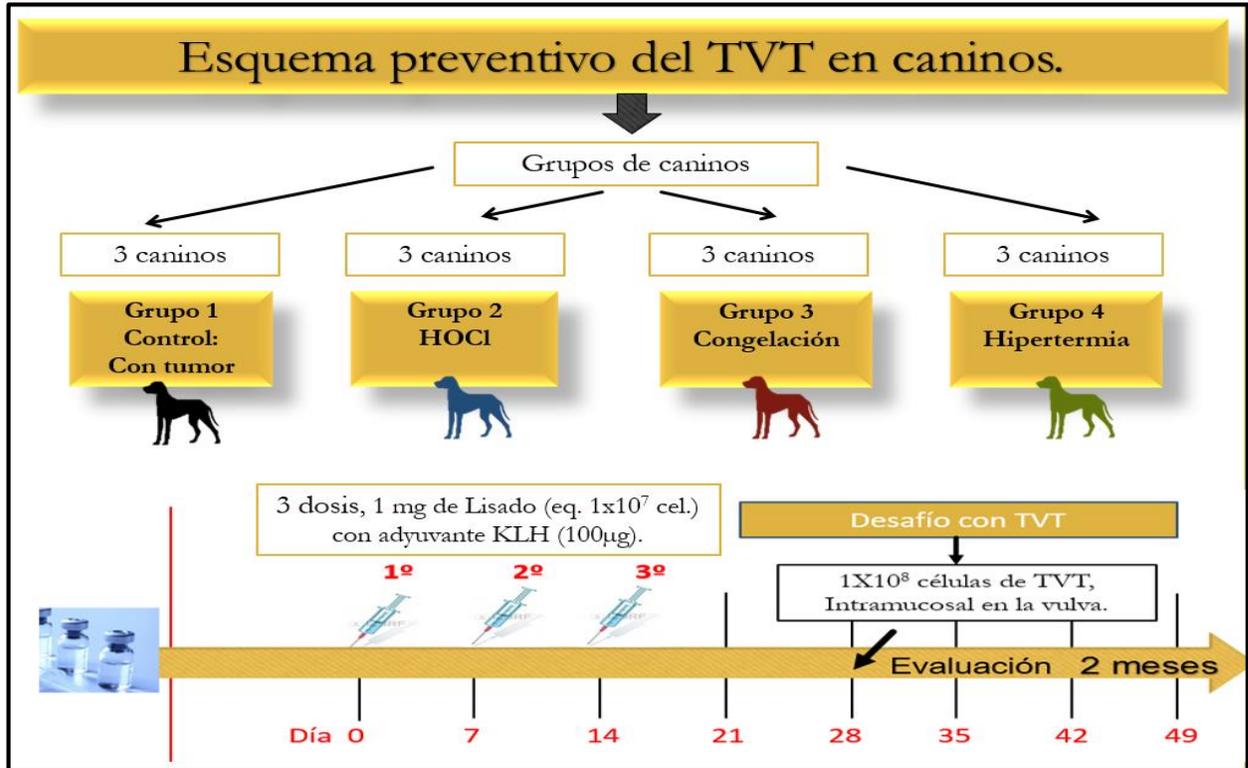
Evaluar la actividad protectora antitumoral en caninos sanos inmunizados con el lisado tumoral del TVT.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de los lisados tumorales sobre la maduración, fagocitosis y producción de citocinas en células dendríticas *in vitro*.
- Cuantificar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica de caninos inmunizados con el lisado del TVT.
- Evaluar la concentración de citocinas (IL-2, IL-12, TNF α e IFN γ) en el suero de caninos inmunizados con el lisado del TVT.
- Determinar la presencia y volumen del Tumor Venéreo Transmisible en caninos inmunizados posterior al desafío con TVT.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Diseño experimental



5.2 Animales

Para evaluar la vacuna de lisado tumoral en la prevención del TVT, los caninos fueron donados por el centro antirrábico del municipio de Guadalupe, 1-3 años de edad, 5-10 kg, libre de las siguientes enfermedades infecciosas; Parvovirus canino, Destemper canino y Erliquiosis determinado con el uso del kit comercial prueba rápida IDEXX, libre de endoparásitos y ectoparásitos, condición corporal 3 según el sistema de medición 1-5, aparato reproductor completo y sexualmente maduros. Los caninos fueron distribuidos en los diferentes grupos (**Tabla 1**). Los caninos fueron supervisados diariamente durante el tiempo del experimento y actuando con base en lo establecido por la norma NOM-062-ZOO-1999 (Chou et al., 2009).

Tabla 1. Grupos experimentales.

Grupos	Tratamientos	Animales por grupo
1. Control	Con tumor sin TX	3
2. Evaluación	Lisado HOCl-L	3
3. Evaluación	Lisado HS-L	3
4. Evaluación	Lisado FT-L	3

5.3 Tumor Venéreo Transmisible

Para la obtención del lisado tumoral (mix de antígenos tumorales de distintas muestras) se recolectaron 5 biopsias del tumor de caninos diagnosticados con TVT por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL con base en características clínicas e histológicas: localización anatómica en órganos genitales, múltiples nódulos de 2-3 cm con aspecto de coliflor, de consistencia friable con zonas de hemorragias. Aspectos histopatológicos, morfología celular; 14-30µM, redonda a poliédrica, núcleo central, 1 o 2 nucléolos, citoplasma ligeramente granular con presencia de vacuolas. Los caninos no recibieron algún protocolo de quimioterapia o radioterapia,

las biopsias tumorales fueron tomadas con previa sedación de los caninos y en condiciones de asepsia. A continuación se llevó a cabo el mantenimiento de las células de TVT mediante un cultivo primario, a partir de una biopsia, la muestra fue disgregada con la ayuda de pinzas y tijeras estériles, continuando con una digestión mecánica y enzimática con tripsina (tripsina-EDTA .25%, Gibco) incubando a 37°C por 5 minutos, después la suspensión se filtró a través de una membrana milipore de 30µM, se tomaron 8 mL de la suspensión celular y se mezcló con 4 mL de Ficoll (Sigma Histopaque, densidad 1.077) para separación por gradiente, se centrifugo a 820 x g a 18°C por 25 minutos, después de la centrifugación las células de TVT se depositaron en la interface y los TIL en el fondo, las células de TVT fueron colectadas y lavadas 2 veces con 10 mL PBS 1X estéril, al final se obtuvieron células purificadas de TVT que se incubaron en placas de 6 pozos en un volumen final de 2 mL de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% a 37°C por 48 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ (Golovnik *et al.*, 2007).

5.4 Preparación del lisado tumoral

Se obtuvieron 10 gr de cada biopsia las cuales fueron mezcladas para la obtención del lisado tumoral total. Todas las muestras fueron mezcladas y disgregadas mecánicamente en un sistema automatizado de cuchillas (Becton Dickinson, Medimachine) con solución PBS estéril para su dilución, creando una suspensión de células que fueron filtradas a través de una membrana milipore de 30µM, 80 mL de la suspensión celular se mezclaron con 40 mL de Ficoll (Sigma Histopaque, densidad 1.077) para separación por gradiente, se centrifugo a 820 x g por 25 minutos a 18°C, posterior a esto se realizaron los diferentes lisados tumorales como se describe a continuación: se llevó a cabo un conteo y ajuste de células de TVT a 1×10^5 por cada mL de HOCl (400 µM) y se incubo durante 1 h a 37°C para la lisis celular, posteriormente el exceso de HOCl fue eliminado por medio de lavados (dos veces) con HBSS, 500 x g por 20 minutos a 18°C, eliminando el sobrenadante y obteniendo el pellet celular con los antígenos tumorales. Para la obtención del lisado de TVT por hipertermia las células fueron tratadas con calor, 1×10^6 células se depositaron en 1ml de PBS, se incubo a 60°C durante 30 min para la lisis celular, posterior a esto se realizaron dos lavados con HBSS, centrifugando a 820 x g por 25 minutos a 18°C, eliminado el sobrenadante y recuperando el pellet celular. Las células de TVT también fueron sometidas a tratamiento por congelación-descongelación, 1×10^7 células de TVT suspendidas en 1ml de PBS

fueron sumergidas en nitrógeno líquido a -20°C por 4 ciclos, cada ciclo por un periodo de una hora, posterior a esto se realizaron dos lavados con HBSS, centrifugando a $820 \times g$ por 25 minutos a 18°C , eliminado el sobrenadante y recuperando el pellet celular, en todos los procedimientos se evaluó la viabilidad celular utilizando el kit Anexina/yoduro de propidio y tinción con azul de tripano. Al finalizar se llevó a cabo una cuantificación de las proteínas en cada lisado por medio de la técnica de Bradford (Young *et al.*, 2012).

5.4.1 Acido hipocloroso

La cloración es una modificación oxidativa de las proteínas, se realizó con base en lo descrito anteriormente. La ovoalbumina (OVA, MSA), 2 mg/ml se incubo con HOCl (1Mm) en la presencia y ausencia de taurina (30 mM). La concentración de HOCl (μM) se determinó antes de cada reacción mediante la medición de los espectros de absorción UV a 292 nm utilizando el factor de extinción Coeficiente $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La reacción se incubo a 37°C durante 1 hora, el HOCl en exceso se eliminó por L -metionina en relación de la concentración de 0,44 mg de metionina por 1 mg de OVA / MSA. A continuación el exceso de metionina se dializo frente a tampón de fosfato 0,005 exterior pH 7,4 durante 24 horas a 4°C . La relación de volumen externo al compartimento interno fue de 100/1. Los niveles de HOCl se analizaron en un lector de 450nm inmediatamente (Prokopowicz *et al.* 2010).

5.5 Inmunización con el LTVT

Los caninos de los grupos 2, 3 y 4 fueron inmunizados con el lisado con HOCl, lisado con calor y lisado con frio respectivamente, se administraron 3 dosis de la vacuna con lisado tumoral, vía subcutánea, con un intervalo de 7 días entre cada aplicación, cada dosis contiene 1mg (1 ml vehículo solución inyectable) equivalente a 1×10^7 células de TVT mas el adyuvante KLH (100mg). Posterior a esto se llevó a cabo el desafío con las células de TVT, 15 días después una alícuota de células de TVT (1×10^8) recién cultivadas (48 horas) fueron inoculadas en cada canino, se inocularon las células de TVT en 2 sitios (pared izquierda y derecha) por vía intramucosa, con previa sedación y anestesia local con xilazina al 10% y lidocaína respectivamente, antes de la

inoculación el área fue desinfectada con iodopovidona y alcohol al 70%, para evitar la contaminación (Chou et al., 2009).

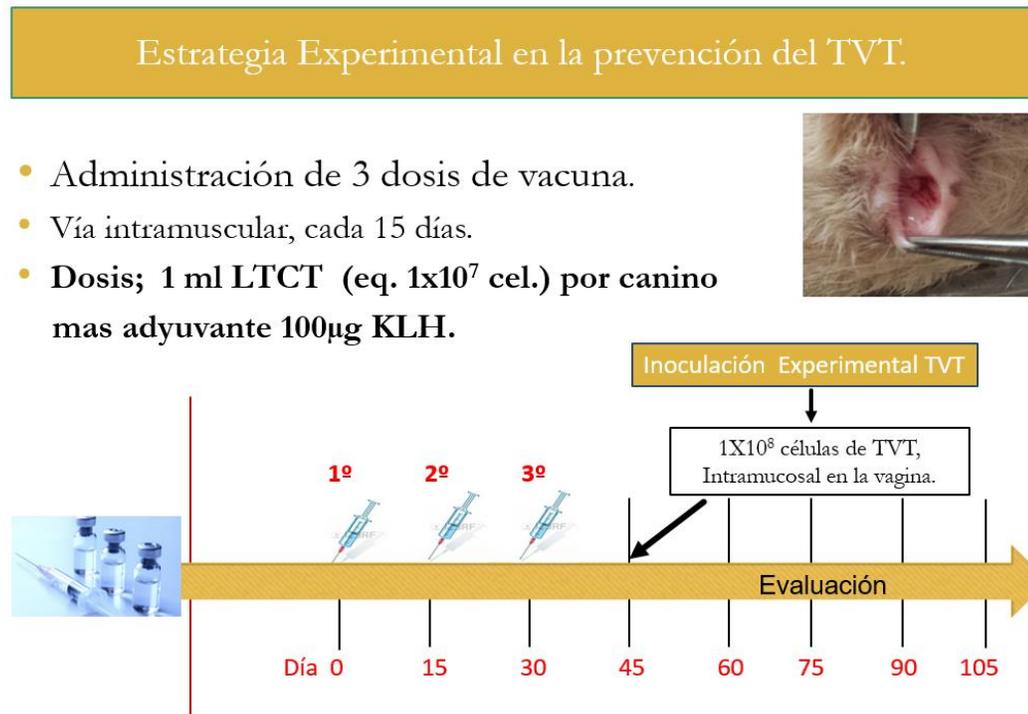


Figura 6. Estrategia experimental en la prevención del TVT (Fotografía tomada y modificada de Ramírez et al., 2010).

5.6 Evaluación de la seguridad e inocuidad del lisado tumoral

Durante la aplicación del esquema de vacunación se llevó a cabo el monitoreo de los posibles efectos secundarios por la inmunización como fiebre, inflamación, anafilaxis, inapetencia, letargia, vómito, diarrea, autoinmunidad, hipersensibilidad, entre otros, actuando de acuerdo a lo establecido por la norma NOM-062-ZOO, siempre cuidando el bienestar animal, en caso de efectos colaterales durante el experimento se llevó a cabo la atención medica veterinaria inmediata y se evaluó la continuación o suspensión del o los caninos en el actual proyecto.

5.6.1 Respuesta inmune celular frente al lisado tumoral

Con el propósito de evaluar la respuesta inmune celular y marcadores de memoria generados por la inmunización con el lisado tumoral, se llevó a cabo una evaluación por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ se evaluaron en sangre periférica utilizando anticuerpos monoclonales específicos, antes y después de la inmunización con el lisado tumoral. Al día 0, 7 y 15 con base en lo anteriormente comentado en la estrategia experimental. Se utilizó un kit comercial triple de anticuerpos monoclonales anti canino CD3:FITC/ CD4:RPE/ CD8:Alexa Fluor de Serotec. Los porcentajes de las diferentes poblaciones de linfocitos fueron analizadas por citometría de flujo (Accuri C6 Becton Dickinson), la intensidad de la fluorescencia se evaluó con el software BD Accuri C6, Michigan USA (Chun et al., 2011). También se llevó a cabo una prueba de especificidad antigénica, con los linfocitos de caninos inmunizados en contra de un cultivo primario de células de TVT. Se recolectaron linfocitos de sangre periférica y se ajustaron a 1×10^6 células en 500 μ L, los cuales fueron agregados a las placas que contienen células de TVT tratadas con mitomicina C en una concentración de 2×10^5 células. La relación final de este co-cultivo entre linfocitos de sangre periférica y células de TVT fue de 10:2. Las placas de 12 pozos que contienen ambas poblaciones celulares se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 24 y 48 horas en medio DMEM con suero fetal bovino al 10%. Al finalizar el período establecido, se evaluó la activación de los linfocitos por medio de un ensayo de linfoproliferación, (kit BD comercial), posteriormente las placas fueron centrifugadas a 1600 rpm por 10 minutos a 20°C y se tomó una muestra de 500 μ L del sobrenadante (Ho et al., 2006). Los sobrenadantes de cada pozo se analizaron por un ensayo de ELISA para detectar la producción de IFN- γ , lo cual indica que los linfocitos T han sido reactivos en contra del tumor, como control se utilizaron linfocitos de caninos no inmunizados, mitógenos y la línea celular B16F10. Para complementar esta fase del estudio se llevó a cabo la prueba de DTH, (reacción de tipo retardado) en caninos inmunizados a los 7 días de finalizar el esquema de vacunación, se aplicó 500 μ g de LTVT vía intradérmica en el sitio 1, 200 μ g de KLH en el sitio 2 y 200 μ L de solución salina en el sitio 3, se evaluó la reacción de hipersensibilidad a las 48 y 72 horas posterior a la inoculación con el fin de determinar la memoria inmunológica a la vacuna.

5.6.2 Evaluación de citocinas en caninos inmunizados

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad de los linfocitos T cooperadores mediante determinación de los niveles de IL-2, IL-12, TNF α e IFN γ en el suero de los caninos inmunizados. El análisis se llevó a cabo antes y después de la inmunización con la vacuna de lisado tumoral utilizando un kit Multiplexed Protein Assays (Biocompare) siguiendo las recomendaciones del fabricante. 50 μ L del buffer diluyente fueron agregados a cada pozo, a continuación se agregó 50 μ L de suero canino a cada pozo, se golpea la placa por 1 minuto gentilmente, se cubrió con una tapa para placas e incubo a temperatura ambiente durante 2 horas. Lo siguiente fue aspirar cada pozo y lavar 5 veces. Se agregó 100 μ L del conjugado a cada pozo y se cubrió con un nuevo sellador de placas incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Se aspiró y lavo 5 veces nuevamente. Se agregó 100 μ L de streptavidina a cada pozo y se cubrió nuevamente con un sellador de placas y se incubo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se aspiró y lavo 5 veces más. Se añadió 100 μ L de solución sustrato a cada pozo. Se incubo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Protegiendo de la luz. Finalmente se agregó una solución stop a cada pozo. Los niveles de cada citosina se analizaron en un lector de 450nm inmediatamente (Hsiao et al., 2008).

5.6.3 Volumen tumoral

Posterior al desafío con las células viables de TVT aplicadas intramucosalmente en órganos genitales, se determinó la presencia y volumen tumoral cada 3 días, midiendo el diámetro y calculando el volumen del tumor (mm) utilizando la siguiente fórmula: longitud (mm) x anchura (mm) x altura (mm) x $\pi/4$), con el uso de calipers, finalmente se comparó el volumen de la masa tumoral entre los caninos de los diferentes grupos (Chou et al., 2009).

5.7 Análisis estadístico

Para comprobar estadísticamente la eficacia de la vacuna en la prevención del TVT se llevó a cabo el siguiente análisis estadístico entre los grupos; Grupo 1: caninos sanos, grupo 2: sin vacuna con tumor, grupo 3: adyuvante KLH y grupo 4 inmunizados con el LTVT. Para el presente trabajo se utilizó ANOVA de una vía y se determinó si existe diferencia significativa mediante Tukey. La diferencia fue considerada como estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo primario del TVT

En la actualidad no existe una línea celular establecida del TVT, por lo cual en el presente estudio se realizó un cultivo primario a partir de una biopsia de TVT diagnosticada por histopatología. Teniendo como objetivo llevar a cabo un ensayo de citotoxicidad celular y la inoculación experimental en hembras caninas. Al microscopio se observaron células con un diámetro de 15-30µm con una morfología redonda, formando algunas ocasiones racimos, con un núcleo prominente el cual ocupaba la mayoría del citoplasma mismo que presentaba un aspecto eosinofílico el cual se encontraba vacuolado.

6.2 Evaluación de la fagocitosis de las células de TVT

Se compararon los tres métodos de preparación (HOCl-L, HS-L y FT-L) del lisado tumoral para pulsar a las CD. Se evaluaron las CD inmaduras para fagocitar las diferentes preparaciones de lisado. Las CD fagocitaron más eficazmente las células de TVT tratadas con HOCl-L (62,3%) esto podría ser debido a que las proteínas oxidadas se unen al receptor de LDL, aumentando el proceso de endocitosis mediada por receptor, en comparación con HS-L (42,5%) tratado con calor, incrementando la expresión de HSPs, la HSP70 liberada de podría unirse directamente a TLR4 en DCs para captar las células tumorales, FT-L (39,5%) $P < 0,05$ por 4 horas a 37 ° C. Los ciclos de congelación-descongelación de las células tumorales inducen muerte celular necrótica y causa la liberación de numerosas señales de peligro tales como HMGB-1, DNA, ARN y ácido úrico los cuales pueden unirse al receptor Scavenger-A en las CD a su captación. Se evaluó la transferencia pasiva de los fragmentos de tumor a 4°C, mostrando una limitada fagocitosis lo que confirma que la absorción del lisado fue un proceso activo (Figura 7).

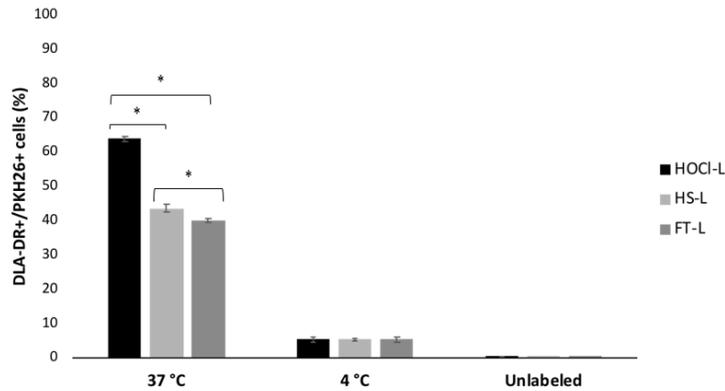


Figura 7. Evaluación de la fagocitosis de las células de TVT. El lisado con HOCl incrementa la fagocitosis por las CDs. Células Dendríticas de perros sanos se co-cultivaron con células TVT tratadas con HOCl-L, HS-L o FT-L durante 4 horas a 37 ° C o 4 ° C para determinar el porcentaje de captación de células tumorales por las CD. El gráfico de barras fue la representación cuantitativa de la captación promedio de 3 individuos diferentes. Los resultados se expresan como media \pm SEM. Tres experimentos se realizaron de forma independiente. P <0,05; (*), P <0.01 (***) por Tukey.

6.2.1 Evaluación de la maduración de CDs y producción de citocinas

Las células dendríticas se caracterizan por largas prolongaciones, indispensables para la sinapsis inmunitaria con los linfocitos T y activación de una respuesta inmunitaria, la figura 8 muestra la morfología de las CDs caninas maduras con los diferentes lisados tumorales inmunogénicos. Para confirmar la maduración de las CDs caninas, se evaluó la expresión superficial de CD11c, DLAII-DR, CD80 y CD83, marcadores para CDs maduras. Las células adherentes a las 0 horas expresaron los marcadores específicos de monocitos CD14⁺ (80.1%), CD11c⁻, CD80⁻, CD83⁻ y DLAII⁻. Finalizando el tiempo de maduración de las CD caninas, todas las CDs pulsadas con los diferentes lisados tumorales (HOCl-L, HS-L o FT-L) incrementaron la expresión de CD11c (90.1%, 86.1% y 89.9% respectivamente). La molécula de DLAII expresada únicamente en las células presentadoras de antígeno (CPA) fue elevada en CDs caninas pulsadas con HOCl-L (93,2%) y FT-L (90.3%) en comparación con CDs pulsadas con HS-L (50.4%) P < 0,05. Se evaluaron CDs sin pulsar y CDs pulsados con el adyuvante KLH como controles. La molécula co-activadora CD80 se expresó más en CDs pulsadas con HOCl-L (56.7%) en comparación con HS-L (2.7%) y FT-L (1.7%) P<0.001. El co-activador CD83 también se expresó más en CDs pulsadas con HOCl-L (63.7%) en

comparación con HS-L (12.7%) y FT-L (11.8%) $P < 0.001$. No hubo diferencias significativas entre las DC pulsadas con HOCl-L y CDs pulsadas KLH. Se sabe que las CDs activan el subtipo de células Th1 que juegan un papel importante contra el cáncer. Analizamos la producción de citocinas de tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α) por ELISA. Los resultados mostraron que las CDs caninas maduras con HOCl-L indujeron niveles significativamente más altos de IL-12, IFN- γ y TNF α comparados con CDs pulsados con FT-L, HS-L o PBS solamente $P < 0.01$ (Figura 9). La secreción de IL-2 fue similar en los diferentes grupos. La secreción de IL-12 y el TNF-alpha de CDs pulsadas con HOCl - L se incrementó 5 y 2 veces más en comparación con los CD pulsadas con FT - L, respectivamente.

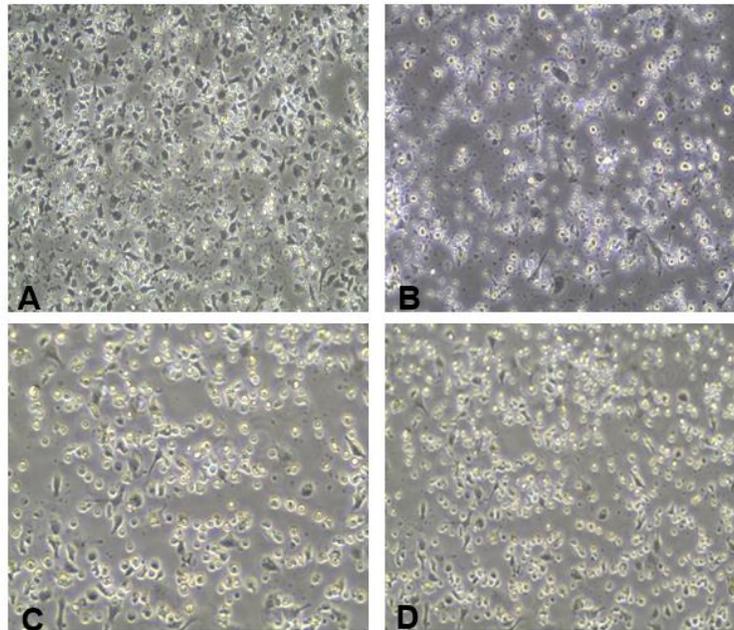


Figura 8. Maduración de células dendríticas con diferentes lisados del TVT. Células dendríticas derivadas de monocitos caninos fueron estimuladas con citocinas o lisado tumoral *in vitro* durante seis días. Células no adherentes que muestran proyecciones citoplásmicas características de la diferenciación de células dendríticas. Microscopía de contraste de fase, barra de escala: 50 μm . A) FT-L. B) HS-L. C) HOCl-L. D) citocinas.

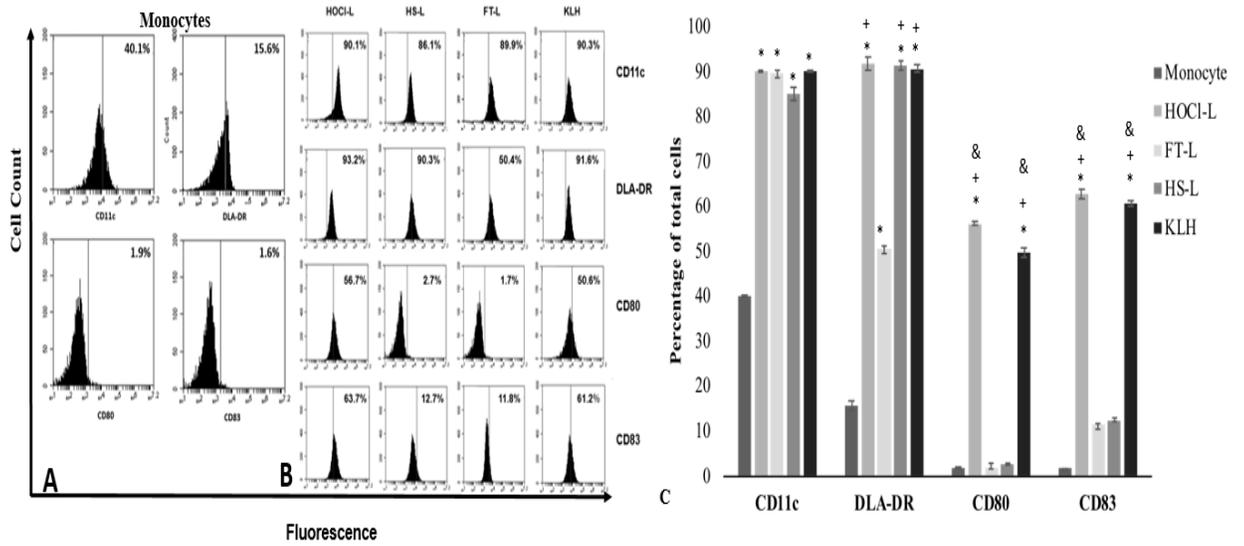


Figura 9. Fenotipificación de células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica. Las células dendríticas fueron aisladas y teñidas de anti-CD11c (a) y anti-DLA-DR (b) para corroborar la pureza del aislamiento y después del lavado con 1X PBS para eliminar el exceso de anticuerpo se evaluaron mediante citometría (c) de flujo utilizando Accuri C6 Becton Dickinson. Resultados representativos de 1 de 3 experimentos.

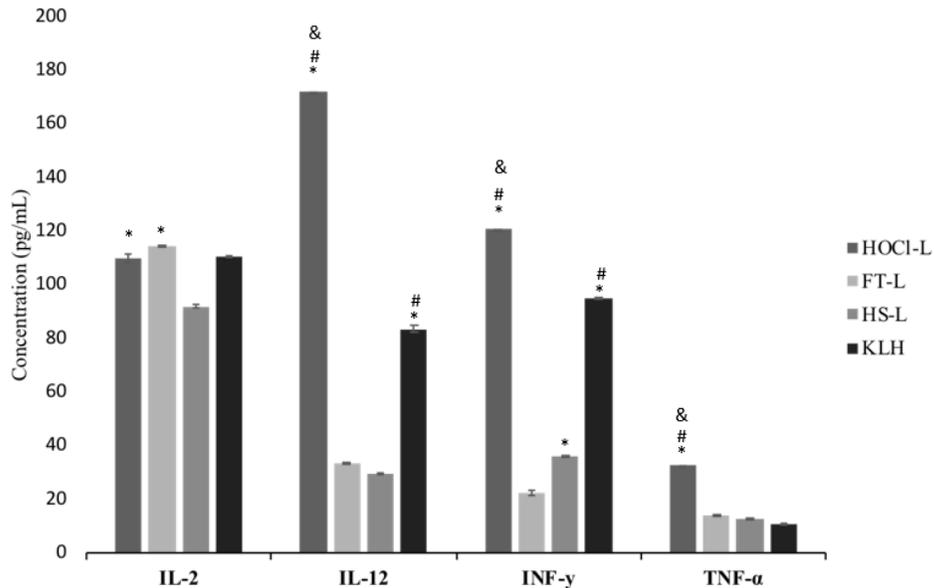


Figura 10. Evaluación del perfil de citocinas de células dendríticas caninas pulsadas con diferentes preparaciones del lisado tumoral de TVT. Producción de IL-2, IL-12, IFN γ y TNF α por las DC caninas maduras con lisado tumoral. Las CD caninas inducidas en 48 horas con GM-CSF e IL-4 se incubaron con cada lisado tumoral. Después de la incubación durante seis días, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de citoquina utilizando el kit ELISA. Los resultados se expresan como media \pm SEM. Tres experimentos se realizaron de forma independiente. P <0,05; (*), P <0.01 (**), P <0.001 (***) por Tukey.

6.3 Las CD caninas cargadas con HOCl-L promueven la activación de células T CD8⁺ secretoras de IFN γ

Después de 6 días de cocultivo, se tomó una muestra sobrenadante de los diferentes pocillos con CD-linfocitos caninos y se analizó la producción de IFN- γ . Se obtuvo una alta producción de IFN- γ de 446,88 pg / ml cuando se co-cultivaron linfocitos con células dendríticas pulsadas con HOCl-L comparado con HS-L 212,2 pg / mL y FT-L 180,3 pg / mL (P < 0,01) Cuando los linfocitos fueron co-cultivados con células dendríticas que no fueron pulsadas con antígeno o cuando los linfocitos sólo se estimularon con citocinas (IL-2) la producción fue inferior 95,8 pg / mL y 88,87 pg / mL (P < 0,001) respectivamente (Fig11). Estos datos

sugirieron que los DC caninos estimulan con el lisado tumoral HOCI-L oxidado dando como resultado la activación de células T CD8 específicas de TVT. La producción específica de IFN γ de más de 200 pg / mL es el criterio de aceptación esencial en protocolos previos para inmunoterapia.

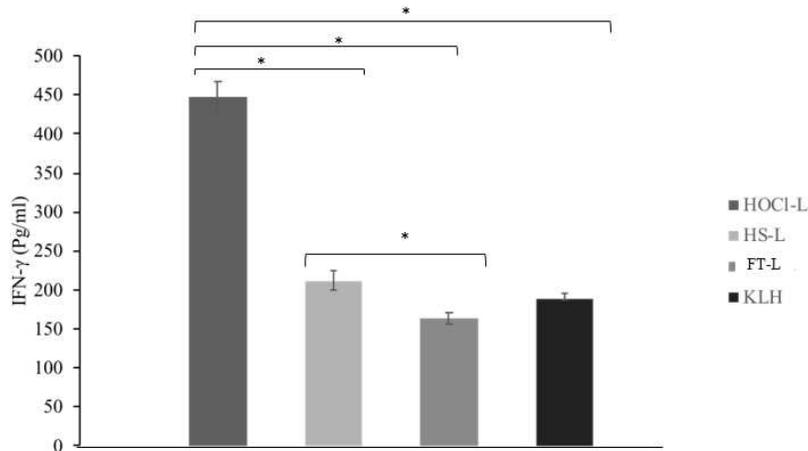


Figura 11. Las DCs caninos cargados con HOCI-L promueven la activación de las células T CD8⁺ secretoras de IFN γ . Después de 6 días de co-cultivo, se tomó una muestra de sobrenadante de los diferentes pocillos con linfocitos-DC caninos y se analizó la producción de IFN- γ . Los resultados se expresan como media \pm SEM. Tres experimentos se realizaron de forma independiente. P <0,05; (*), P <0.01 (**), por Tukey.

6.3.1 CTLs generados por DCs cargados HOCI-L son capaces de matar a las células TVT

Finalmente, se caracterizó la citotoxicidad de los CTL contra las células TVT. Para evaluar las propiedades efectoras funcionales de los CTL generados por diferentes protocolos inmunes, se realizaron ensayos de citotoxicidad in vitro de linfocitos aislados de co-cultivos pulsados con HOCI-L, HS-L y FT-L. La actividad citolítica de las células efectoras se midió mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). El análisis estadístico mostró que el porcentaje de citólisis de CTL-HOCI-L (100%) fue significativamente mayor que CTL-HS-L

(67,5%) y CTL-FT-L (56,7%) $P \leq 0,001$. Por el contrario, los linfocitos co-cultivados no pulsados-DC y KLH-DC mostraron niveles mucho más bajos de lisis de las células diana (Fig.12). Colectivamente, estos datos indicaron que HOCL aumentó la citotoxicidad de CTL contra TVT.

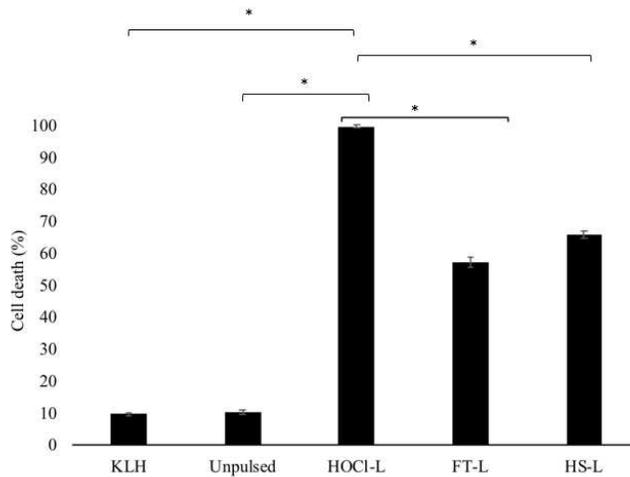
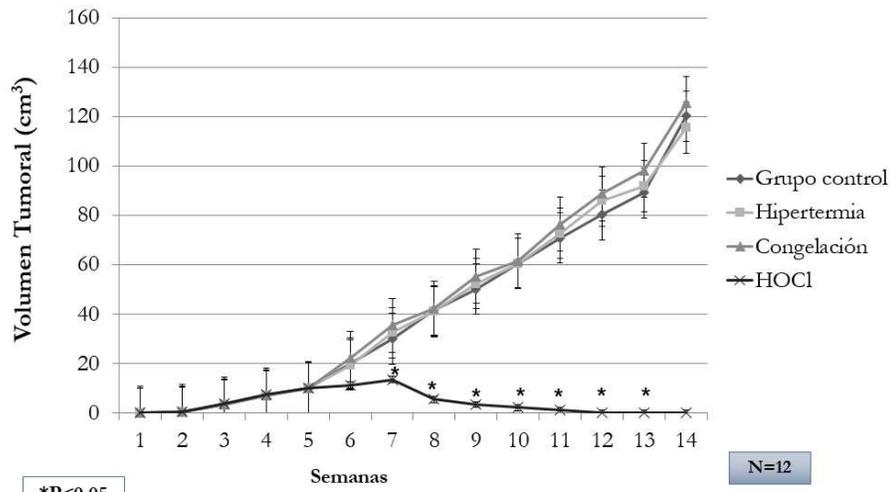


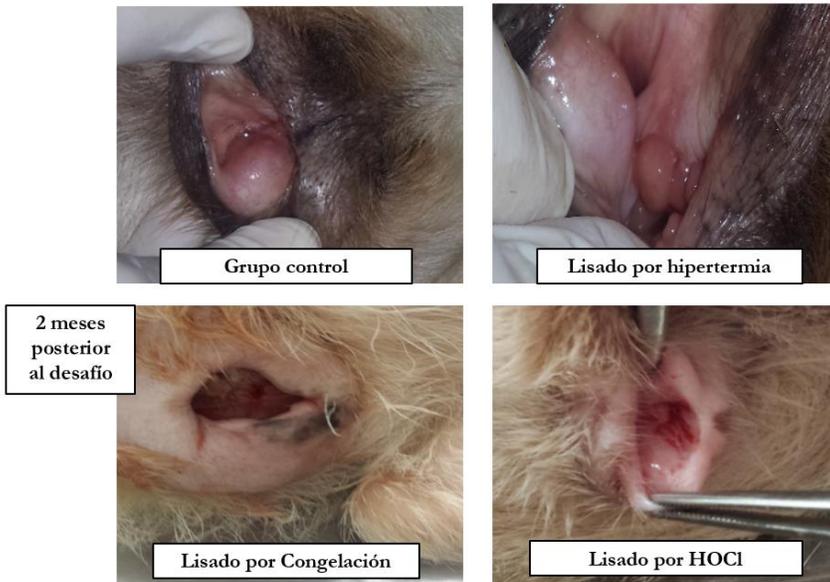
Figura 12. Los CTL generados por los DC cargadas con HOCl-L son capaces de eliminar las células TVT. Para evaluar las propiedades efectoras funcionales de los CTL generados, realizamos ensayos de citotoxicidad *in vitro* de linfocitos aislados de co-cultivo pulsado con HOCl-L, HS-L y FT-L. Los resultados se expresan como media \pm SEM. Tres experimentos se realizaron de forma independiente. $P < 0,05$; (*), $P < 0.01$ (***) por Tukey.

6.4 Inhibición del crecimiento tumoral en caninos inmunizados con lisado del TVT

Los diferentes grupos de caninos fueron inmunizados con el correspondiente lisado tumoral completo (HOCl-L, FT-L, HS-L). Dos semanas después de la última inmunización fueron desafiados con una cantidad de 1×10^8 células viables de TVT recién cultivadas. El crecimiento tumoral fue evaluado por 14 semanas post-inoculación. Los resultados obtenidos demuestran control e inhibición del crecimiento tumoral del grupo HOCl-L, demostrando una acelerada regresión tumoral a partir de la tercera semana de inoculación. Los grupos FT-L y HS-L mostraron un continuo crecimiento tumoral durante todo el experimento (Figura 13).



a)



b)

Figura 13. Inhibición del crecimiento tumoral en caninos inmunizados con lisado del TVT.

A) Los diferentes grupos de caninos fueron inmunizados con el correspondiente lisado tumoral completo (HOCl-L, FT-L, HS-L). B) Imagen representativa de cada grupo de caninos.

6.5 Incremento de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ en sangre periférica de caninos inmunizados con el lisado de TVT.

Se evaluó la población de linfocitos T citotóxicos de los caninos inmunizados con los diferentes lisados del TVT (HOCl-L, FT-L, HS-L). Se determinó el porcentaje de células positivas CD3⁺ CD8⁺ mostrando un incremento de los linfocitos T citotóxicos en la sangre periférica de los caninos inmunizados con HOCl-L (120 células/dl), FT-L 60 células/dl y HS-L 50 células/dl. Lo cual sugiere una eficaz activación de los linfocitos T a través de moléculas del MHC clase I y clase II. Resultado que demuestra una respuesta eficaz citotóxica que podría ayudar al control y eliminación del tumor (Figura 14).

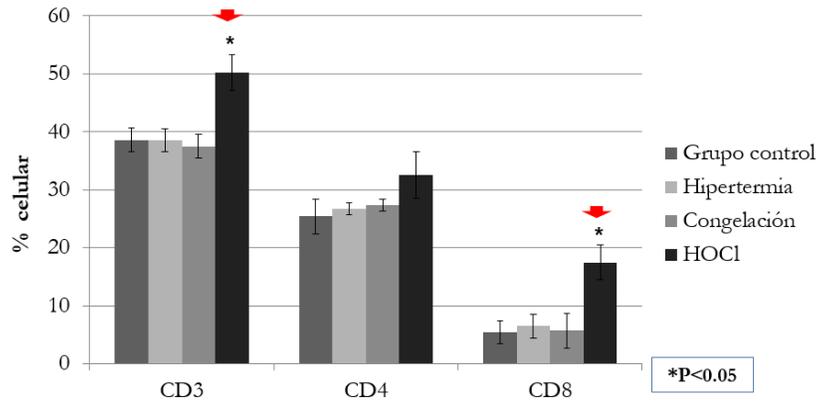


Figura 14. Incremento de los linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica de caninos inmunizados con HOCl-L. Se evaluó la población de linfocitos T citotóxicos de los caninos inmunizados con los diferentes lisados del TVT (HOCl-L, FT-L, HS-L).

6.6 Evaluación del perfil de citocinas en el suero de caninos inmunizados con el lisado del TVT.

Se determinó el perfil de citocinas en suero de los diferentes grupos de caninos inmunizados. Evaluando las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , TNF- α e IL-2 por ELISA. Los caninos inmunizados con HOC1-L mostraron un incremento de IFN- γ , TNF- α e IL-2 a los 15 días posterior a la última inmunización (350pg/ml, 100pg/ml, 80pg/ml respectivamente). El grupo de HS-L mostro 150pg/ml, 60pg/ml, 50pg/ml respectivamente y el grupo FT-L 110pg/ml, 50pg/ml, 50pg/ml. Por lo cual el incremento de las citocinas en el grupo HOC1-L podría estar relacionado con una respuesta antitumoral debido a la activación de una respuesta celular tipo Th1 (Figura 15).

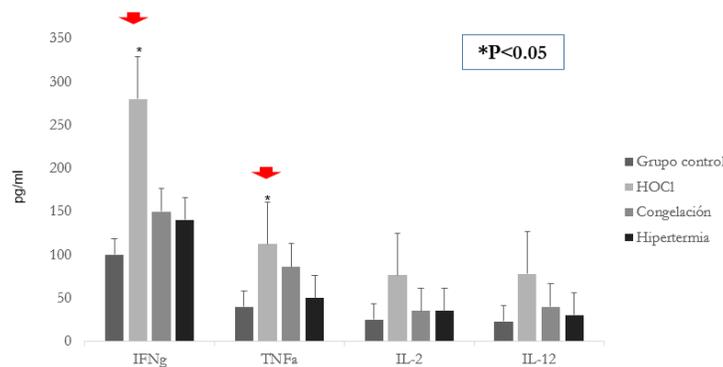


Figura 15. Evaluación del perfil de citocinas en el suero de caninos inmunizados con el lisado del TVT. Se determinó el perfil de citocinas en suero de los diferentes grupos de caninos inmunizados. Evaluando las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , TNF- α e IL-2 por ELISA.

7. DISCUSIÓN

Décadas de experimentación en el modelo preclínico canino han mejorado sustancialmente nuestra comprensión de la biología y la seguridad de la inmunoterapia del cáncer en sujetos con tumor recurrente (Akira *et al.*, 2001). La inmunoterapia es un enfoque prominente contra cáncer de próstata, vejiga, colon, leucemia, pulmón, cerebro, cáncer de ovario y cáncer de mama. El objetivo principal de la inmunoterapia del cáncer es la activación de células T CD8⁺ citotóxicas que atacan el tumor. Las células dendríticas (DCs) son las células más importantes del sistema inmunológico, ya que son las células presentadoras de antígenos más potentes (APC) y son capaces de estimular los linfocitos T naïve y generar linfocitos T de memoria con alto potencial citotóxico específico del tumor (Jones and Cross, 2004). La inmunoterapia con vacunas basadas en DCs es una oportunidad muy atractiva para eliminar el cáncer u ofrecer un beneficio clínico sin enfermedad a largo plazo. Para los cuales se realizan estudios clínicos en pacientes con carcinoma de melanoma, renal, ovárico, de páncreas, colon y pulmón utilizando terapia de vacunas basadas en DCs. Sin embargo, la mayoría de estos pacientes presentan una respuesta clínica deficiente, para lo que son necesarias nuevas estrategias para generar DCs. Una de las razones por las que las vacunas basadas en DCs fallan es la restricción en el reconocimiento de los antígenos tumorales (Akira *et al.*, 2001).

Las células dendríticas tienen la capacidad de presentar antígenos tumorales para estimular una potente respuesta antitumoral (Chen *et al.*, 2013). Los métodos actuales para pulsar las DCs con lisados de células tumorales obtenidos por estrés por choque térmico y ciclos de congelación-descongelación se han aplicado ampliamente en sujetos con cáncer, sin embargo, estudios previos han demostrado que ambos lisados suprimen la maduración de DCs *ex vivo* y son ineficaces para terapias contra el cáncer. Además, el principal desafío de la inmunoterapia es la falta de obtención de antígenos tumorales, por lo que la activación eficiente de la respuesta inmune antitumoral no es posible. Los lisados tumorales son fuentes prometedoras de antígeno para la vacuna basada en DCs, ya que contienen muchos epítomos inmunogénicos relevantes que podrían prevenir el escape del tumor. Todos los sujetos son elegibles para la terapia de lisado tumoral independientemente de su tipo HLA. Los lisados tumorales también proporcionan una fuente de todos los antígenos del tumor, evitando la necesidad de identificar el antígeno óptimo para un tipo de tumor específico. La respuesta T policlonal dirigida contra múltiples epítomos contrarresta la pérdida o cambio de epítomos tumorales. Sin embargo, los lisados tumorales se pueden preparar por varios métodos para inducir la muerte celular que podría afectar la inmunogenicidad de la terapia. Obteniendo lisados tumorales por

estrategias diferentes tales como choque térmico, ciclos de congelación-descongelación o métodos químicos (HOCl) para inducir células tumorales inmunogénicas (Ingram *et al.*, 2000).

El HOCl también es capaz de potenciar la inmunogenicidad de los antígenos proteicos incrementando su captación y procesamiento por las células presentadoras de antígenos, así como la activación de linfocitos T específicos (Rescigno *et al.*, 2007). El tratamiento de las células tumorales ováricas con HOCl induce una necroptosis primaria rápida, aumentando la captación de células tumorales ováricas por las DCs y activando células T específicas de tumor. El HOCl también mejora la inmunogenicidad de los antígenos proteicos marcándolos con aldehídos y desdoblándolos para exponer los péptidos inmunogénicos a las células T. La modificación oxidativa con el ácido hipocloroso de las células tumorales aumenta la inmunogenicidad del lisado tumoral y, posteriormente, mejora la capacidad de DC para producir citocinas tipo Th1, esto podría explicarse debido a la muerte necrótica de células tumorales, liberación de antígenos tumorales, inhibición de (TGF- β e IL-10), inducción de señales de peligro y liberación como calreticulina, HSP70, HSP90, ATP y liberación de la proteína de unión a la cromatina no histona, grupo de alta movilidad B1 (HMGB1), cada uno de las cuales interactúa con TLR4, receptores Scavenger, LRP1, NOD1 y NOD2 promoviendo la maduración de las células dendríticas. Estudios anteriores indicaron que HSP70 podría mejorar la maduración de las DCs a través de la interacción entre CD40 y CD40L, con un estímulo eficiente para la producción de todas las citocinas Th1 y el aumento de CD80 y CD83 y MHCII (Gao *et al.*, 2013). Las DCs de caninos obtenidos a partir de sangre periférica tienen características funcionales y morfológicas similares a las DCs mieloides humanos (CD11c⁺ / HLA-DR⁺ / CD14⁻) que producen altos niveles de IL-12 e IFN γ cuando se estimulan con citocinas permitiendo una diferenciación de tipo Th1.

Se confirmó la diferenciación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en DCs debido a alta expresión de CD11c y expresión negativa CD14⁻. Se ha descrito que la expresión baja de CD14⁺ es característica de DCs e inducidas por IL-4, resultando en la regulación negativa de CD14. Se demostró una mayor inmunogenicidad de las DCs de caninos pulsadas con HOCl-L en comparación con las DCs pulsadas con HS-L o FT-L debido a la capacidad de mantener un fenotipo de células dendríticas maduras correlacionadas con una respuesta inmune antitumoral. Estudios anteriores de las DC de caninos considero el fenotipo CD11c, DLA clase II, CD80, y CD83 muy importante para determinar el grado de diferenciación de las DCs correlacionado con el tipo respuesta inmune y respuesta clínica (Harrington *et al.*, 2007). Estudios anteriores presentan la hipótesis de que

sobre-regulación de CD80 o CD83 después de la unión a la ligadura de TLR4 en DCs proporciona un alto nivel de señalización a través de la molécula CD28, esencial para la activación de los linfocitos T citotóxicos. Hemos encontrado que los niveles de CD11c, CD80, CD83, y DLAII en DCs fueron significativamente mayor después de la estimulación con HOCl en estudios realizados en humanos y el ratones (Erolesa *et al.*, 2012). Nuestros datos son también coherentes con la anterior conclusión de que el KLH incrementa las moléculas CD80 y CD83 en DCs de caninos, comparable a humanos y ratones, donde los niveles de ambas moléculas de superficie mencionadas suelen aumentar significativamente durante la maduración de las DCs. Se confirmó un aumento en la expresión de las moléculas MHC clase II, CD80, CD83, y secreción de altas cantidades de IL-12, IFN γ y TNF α . Los altos niveles de expresión de CD80 y CD83 después del tratamiento con HOCl-L aportó más pruebas de que las DCs habían madurado. En los seres humanos CD83 un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, se ha demostrado el incremento después de la maduración de las DCs. Las DCs pulsadas con HOCl-L expresaron el nivel más alto de DLA-DR y CD83, mientras que las DCs pulsadas con FT-L también presentó alta expresión de DLA-DR pero expresaron niveles más bajos de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD83). La expresión de DLA-DR en la superficie de las DCs pulsadas con HOCl-L mantuvo en el mismo nivel que en los controles (cóctel de citocinas). La inducción de MHC clase II requiere vinculación entre DCs y linfocitos Th1 cooperadores, que es importante para la inducción de linfocitos T específicos de tumor. Estudios anteriores mostraron que las HSPs, pueden llevar antígenos tumorales y ampliar el repertorio para las APCs (Gillison, 2004). Además las HSPs inducidas por el estrés de calor estimula las DCs e inducción de citocinas y secreción de quimioquinas. Estos hallazgos demuestran además que nuestro protocolo es eficiente en la generación de CDs de caninos. Las DCs desempeñan un papel crítico en la inducción de linfocitos Th1. A continuación se evaluaron los niveles de citocinas Th1 de CDs caninas pulsadas con lisados tumorales (HOCl-L, HS-L o FT-L). Los sobrenadantes de cultivo se evaluaron 24 horas después del tratamiento con lisados tumorales. Las DCs con HOCl-L incrementaron los niveles de IL-12, TNF α e IFN- γ en comparación con los otros lisados. Se observó que el HOCl-L aumento la IL-12 en comparación con los otros grupos (Kakimi *et al.*, 2009).

Estudios anteriores han demostrado que los linfocitos CD8⁺ tienen un papel importante en el control del crecimiento tumoral. Anteriormente se mostró que, aunque el efecto de la maduración DCs estimulado con cóctel de citocinas (TNF- α , IL- β , IL-6 e IFN- α) fue notable, la cantidad de citocinas Th1 segregado por DCs pusadas con citocinas y la citotoxicidad contra las células diana fue mucho

menor que la producida a partir de DCs pulsadas con lisado tumoral. Por ejemplo, los linfocitos T citotóxicos median la inmunidad antitumoral. Los linfocitos CD4⁺ Th1 expresan alta cantidad de IL-12, TNF- α e IFN- γ y desempeñan un papel importante en la activación de CTLs a través de la liberación de IL-2 (Hunder *et al.*, 2008). En este estudio la estimulación con HOCl-L fue el único método efectivo para cebar las células T CD8⁺ y CD4⁺. Este resultado indica que el HOCl-L no sólo se procesa para la presentación del MHC clase I, sino que también se presenta en forma cruzada por la vía del MHC de clase II, consistente con la elevación de las moléculas de clase II (DLA-DR). La experimentación adicional mostró que el porcentaje y el número de células Th1 (incluyendo células que secretan IFN- γ) aumentaron en células T co-cultivadas con DCs pulsadas con HOCl, lo que apoya fuertemente la elección de HOCl-L como activador de los CTLs específicos contra el TVT. La respuesta celular TCD8⁺ inducida por HOCl-L puede beneficiarse de la producción de HSP70 y HSP90. Es razonable postular que el desarrollo de una mayor activación de linfocitos T específicos de tumor podría desencadenar un fuerte respuesta antitumoral a partir de CDs pulsadas con HOCl-L. Determinamos que el HOCl-L efectivamente madura DCs de caninos, con un fuerte aumento citocinas Th1, promoviendo la activación eficiente de células T con una polarización una de tipo Th1 (Estrada *et al.*, 2002).

8. CONCLUSIONES

- El lisado tumoral obtenido con HOCl estimula la maduración y activación de células dendríticas *in vitro*.
- La vacunación con el lisado tumoral obtenido con HOCl incrementó la población de linfocitos CD8⁺ en sangre periférica.
- La vacunación con el lisado tumoral obtenido con HOCl incrementó la concentración de TNF α e IFN γ en suero.
- La vacunación con el lisado tumoral obtenido con HOCl disminuyó el crecimiento tumoral.

9. LITERATURA CITADA

1. Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, et al. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother.* 2004; 27:452–9.
2. M. Isotani, K. Katsuma, K. Tamura, M. Yamada, H. Yagihara, D. Azakami, K. Ono, T. Washizu, M. Bonkobara. Efficient generation of canine bone marrow-derived dendritic cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2006; 68:809–814.
3. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93:2588–2592.
4. Murchison EP, Wedge DC, Alexandrov LB, Fu B, Martincorena I, et al. Transmissible Dog Cancer Genome Reveals the Origin and History of an Ancient Cell Lineage. *SCIENCE.* 2014; 343: 437-440.
5. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer Cell. 2006; 126:477–487.
6. Liu CC, Wang YS, Lin CY, Chuang TF, Liao KW, Chi KH, Chen MF, Chiang HC, Chu RM. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol. Immunother.* 2008; 57:479–491.
7. Ibisch C, Pradal G, Bach JM, Lieubeau B. Functional canine dendritic cells can be generated in vitro from peripheral blood mononuclear cells and contain a cytoplasmic ultrastructural marker. *J. Immunol. Methods.* 2005; 298:175–182.
8. Prins MR, Wang X, Soto H, Young E, et al. Comparison of glioma-associated antigen peptide-loaded versus autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination in malignant glioma patients. *J Immunother.* 2013; 36: 152–157.
9. Chiang CL, Ledermann JA, Aitkens E, Benjamin E, Katz DR, Chain BM. Oxidation of ovarian epithelial cancer cells by hypochlorous acid enhances immunogenicity and stimulates T- cells that recognize autologous primary tumor. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:4898–907.
10. Goto-Koshino Y, Ohno K, Nakajima M, Mochizuki H, Kanemoto H, Tsujimoto H. A rapid and simple method to obtain canine peripheral blood-derived macrophages. *J. Vet. Med. Sci.* 2011; 73:773–778.

11. Chiang CL, Benencia F, Coukos G. Whole tumor antigen vaccines. *Semin Immunol.* 2010; 22:132–43.
12. Chan B, Leel W, Yeung DW. Adoptive cellular immunotherapy for non-small cell lung cancer: a pilot study. *Cytotherapy.* 2003; 5:46 – 54.
13. Leen AM, Myers GD, Sili U, Huls MH, Weiss H, Leung KS. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med.* 2006; 12:1160–6.
14. Polton GA, Brearley MJ, Powell SM, Burton CA. Impact of primary tumour stage on survival in dogs with solitary lung tumours. *J Small Anim Pract.* 2008; 49:66–71.
15. Itoh H, Horiuchi Y, Nagasaki T, Sakonju I, Kakuta T, Fukushima U, et al. Evaluation of immunological status in tumor-bearing dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 132:85–90.
16. Atsutaka N, Toru K, Keiko N, Masashi S, Kazuro I, Ryuji M, Takashi K, Shigenori G. Impaired and imbalanced cellular immunological status assessed in advanced cancer patients and restoration of the T cell immune status by adoptive T-cell immunotherapy. *International Immunopharmacology.* 2014; 18:90-97.
17. Pai C, Kuob TF, Maoc JT, Chuanga TF, Lina CS, Chua RM. Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2011; 139:187–199.
18. Fadul CE, Fisher JL, Hampton TH, Lallana EC, Li Z, Gui J, et al. Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy. *J Immunother.* 2011; 34:382–9.
19. Thompson JA, Curti BD, Redman BG, Bhatia S, Weber JS, Agarwala SS. Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2034–2039.
20. Boghossian S, Robinson S, Von Delwig A, Manas D, White S. Immunotherapy for treating metastatic colorectal cancer. *Surgical Oncology.* 2012; 21:67-77.

21. Larmonier N, Cantrell J, Lacasse C, Li G, Janikashvili N, Situ E, et al. Chaperone-rich tumor cell lysate-mediated activation of antigen-presenting cells resists regulatory T cell suppression. *J Leukoc Biol.* 2008; 83:1049–59.
22. Chen SL, Fan A, Shan W, Chuang TF, Chiang Y, Chu RM. IL-6 restores dendritic cell maturation inhibited by tumor-derived TGF- β through interfering Smad 2/3 nuclear translocation. *Cytokine.* 2013; 62:352–359.
23. Chiang CL, Lana E, Tanyi J, Hagemann AR, Motz GT, Svoronos N, Montone K, Smith L, Nisenbaum HL, Levine BL, Kalos M, Czerniecki BJ, Torigian DA, Powell DJ, Mick R and Coukos G. A Dendritic Cell Vaccine Pulsed with Autologous Hypochlorous Acid-Oxidized Ovarian Cancer Lysate Primes Effective Broad Antitumor Immunity: From Bench to Bedside. *Clin Cancer Res.* 2013; 19; 4801–15.
24. Spitzbarth I, Baumgärtner W, Beineke A. The role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2012; 147:6–24.
25. Dauer M, Schad K, Herten J, Junkmann J, Bauer C, Kiefl R, Endres S, Eigler A. FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *Journal of Immunological Methods.* 2005; 302:145– 155.
26. Prokopowicz ZM, Arce F, Biedron R, Chiang CL-L, Ciszek M, Katz DR, et al. Hypochlorous acid: a natural adjuvant that facilitates antigen processing, cross-priming, and the induction of adaptive immunity. *J Immunol.* 2010; 184:824–35.
27. Emens LA, Jaffee EM. Immunotherapy and Cancer Therapeutics: Why Partner? *Cancer Immunotherapy.* 2007; 12:207-233.
28. Bund D, Buhmann R, Gökmen F, Kremser A, Dreyssig J, Kolb JH, Schmetzer MH. Canine-DCs using different serum-free methods as an approach to provide an animal-model for immunotherapeutic strategies. *Cell. Immunol.* 2010, 263:88–98.
29. Ramadan G. Generation of functional monocyte-derived fast dendritic cells suitable for clinical application in the absence of interleukin-6. *Cytotechnology.* 2011; 63:513–521.
30. Chau G-Y, Wu C-W, Lui W-Y, Chang T-J, Kao H-L, Wu L-H, et al. Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2000; 231:552–8.

31. Huang YA, Hayes RL, Wertheim SD, Arbit E, Scheff RF. Treatment of refractory recurrent malignant glioma with adoptive cellular immunotherapy: a case report. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2001; 57:17–23.
32. Mielcarek M, Kucera AK, Nash R, Torok-Storb B, Mckenna J. Identification and characterization of canine dendritic cells generated in vivo. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2007; 13:1286–1293.
33. Bu N, Wu H, Zhang G, Zhan S, Zhang R, Sun H, Du Y, Yao L, Wang H. Exosomes from Dendritic Cells Loaded with Chaperone-Rich Cell Lysates Elicit a Potent T Cell Immune Response Against Intracranial Glioma in Mice. *J Mol Neurosci*. 2015; 56:631–643.
34. Hardwick N, Ledermann J, Aitkens E, Chain B. Pre-clinical assessment of autologous DC-based therapy in ovarian cancer patients with progressive disease. *Cancer Immuno Immunother*. 2012; 61:1929–39.
35. Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, Gonzalez FE, Ramirez M, Reyes D, Pereda C, Hevia D, Garcia T, Salazar L, et al. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:2474-83.
36. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical and molecular entity. *Semin Oncol*. 2004; 31:744-754.
37. Lambert LA, Gibson GR, Maloney M, Durell B, Noelle RJ, Barth RJ Jr. Intranodal immunization with tumor lysate-pulsed dendritic cells enhances protective antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001; 61:641–6. 38.
38. Bercovici N, Haicheur N, Massicard S, Vernel-Pauillac F, Adotevi O, Landais D, Gorin I, Robert C, Prince HM, Grob JJ, et al. Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *J Immunother*. 2008; 31:101-12.
39. Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, Nakatsuka K, Wakabayashi A, Sakamoto C, Takahashi H. Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*. 2013; 1:23-28.

40. Burger UL, Chang MP, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Recruitment of host CD8 + T cells by tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 during adoptive immunotherapy of cancer. *SURGERY*. 1995; 117:325-333.
41. Hsiao YW, Liao, Shao KW-Min CW. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Secretion of IL-6 Antagonizes Tumor-Derived TGF- β 1 Killing Activity and Restores the Lymphokine-Activated. *J Immunol*. 2004; 172:1508-1514.
42. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12:860-75.
43. Carvalho CM, Bonnefont-Rebeix C, Picandet S, Bernaud J, Phothirath P, Chabanne L, Marchal T, Magnol JP, Rigal D. Evaluation of elutriation and magnetic microbead purification of canine monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2004; 101:171–178.
44. Friedmann MD, Eshhar Z. Adoptive immunotherapy of cancer using effector lymphocytes redirected with antibody specificity. *Update on cancer therapeutics*. 2006; 1:25–32.
45. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans *Nat. Rev. Cancer*. 2008; 18:147–156.
46. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007; 13:54-61.
47. Page `s F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27:5944–5951.
48. Li G, Zeng Y, Chen X, Larmonier N, Sepassi M, Graner MW, et al. Human ovarian tumour-derived chaperone-rich cell lysate (CRCL) elicits T cell responses in vitro. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148: 136–45.
49. Jones AV, Cross NC. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Moll Life Sci*. 2004; 61: 2912-23.

50. Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis*. 2009; 14:364-75.
51. Salamanca S, Santader BA, Triana PA, Romero S, Rondón B. Transmittable venereal tumour (TVT) with pulmonary metastasis: a case report. *Orinoquia*. 2008; 12:162-170.
52. Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X. Tumor educated CD11b high a low regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol*. 2009; 182:6207–6216.
53. Wang YS, Chi KH, Chu RM. Cytokine profiles of canine monocyte-derived dendritic cells as a function of lipopolysaccharide- or tumor necrosis factor-alpha-induced maturation. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2007; 118:186–198.
54. Sugiura K, Wijewardana V, Fujimoto M, Akazawa T, Yahata M, Mito K, Hatoya S, Inoue N, Inaba T. Effect of IL-12 on canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2010; 137:322–326.
55. Wang YS, Chi KH, Liao KW, Liu CC, Cheng CL, Lin YC, Cheng CH, Chu RM. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. *Can. J. Vet. Res*. 2007; 71:165–174.
56. Rochman Y, Spolski R, Warren J. New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:480-488.
57. Bonnefont-Rebeix C, Carvalho CM, Bernaud J, Chabanne L, Marchal T, Rigal T. CD86 molecule is a specific marker for canine monocyte-derived dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2006; 109:167–176.
58. Ying Y, Chuanga TF, Guichardb C, El-Garchb H, Tiernyc D, Taiching L, Lina C, Chioud KH, Tsaid C, Hsuan L, Chiuan L, Fischerb L, Chua RM. Chicken HSP70 DNA vaccine inhibits tumor growth in a canine cancer model. *Vaccine*. 2011; 29: 3489–3500.
59. Kathrani A, Schmitz S, Priestnall SL, Smith KC, Werling D, Garden OA, Allenspach K. CD11c+ cells are significantly decreased in the duodenum, ileum and colon of dogs with inflammatory bowel disease. *J. Comp. Pathol*. 2011; 145: 359–366.
60. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev*. 2010; 234:45–54.

61. Chiang CL, Kandalaft LE, Coukos G. Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines. *Int Rev Immunol*. 2011 30: 150–182.
62. Ardavin C, Martinez G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez V. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*. 2001; 22:691–700.
63. Bird RC, Deinnocentes P, Church AE, Ginkel FW, Lindquist J, Smith BF. An autologous dendritic cell canine mammary tumor hybrid-cell fusion vaccine. *Cancer Immunol. Immunother*. 2011; 60:87–97.
64. Wasserman J, Diese L, VanGundy Z, London C, Carsonb WE, Papenfuss TL. Suppression of canine myeloid cells by soluble factors from cultured canine tumor cells. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2012; 145:420–430.

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Alex Jesús Hernández Granados

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Tesis: DESARROLLO DE UNA VACUNA DE LISADO TUMORAL PARA LA
PREVENCIÓN DEL TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO.**

Campo de Estudio: Inmunobiología del Cáncer

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León, México, el 12 de Julio de 1989 hijo de Alejandro Hernández Serrano y Beatriz Granados Martínez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Médico Veterinario y Zootecnista en 2013, estudiante talento durante toda mi licenciatura, con mención honorífica y merito académico por primer lugar de generación 2008-2012.

Maestría en ciencias con Orientación en Inmunobiología 2013-2015.

Experiencia Profesional: Médico Veterinario y Zootecnista en México.